

13 AUG 2003



REC'D 25 AUG 2003
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 30 220.0

Anmeldetag: 04. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz
in Pflanzen

IPC: A 01 H, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Perofsky

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogeninduzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

10 Palatinose (Isomaltulose) und Trehalulose werden großtechnisch aus Saccharose durch eine enzymatische Umlagerung unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen hergestellt. Dabei wird die zwischen den Monosacchariden des Disaccharids Saccharose bestehende ($\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zu einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung

15 bei Palatinose bzw. einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung bei Trehalulose isomertisiert. Diese Umlagerung von Saccharose zu den beiden nicht-kariogenen Disacchariden erfolgt unter Katalyse des bakteriellen Enzyms Saccharoseisomerase, auch Saccharosemutase genannt. Entsprechende Sequenzen sind beispielsweise in WO 95/20047

20 (US 5,786,140; US 5,985,622) beschrieben.

Ferner sind beschrieben Saccharoseisomerasen aus *Erwinia rhabontici* (palI Gen, GenBank Acc.-No.: AF279281; Börnke et al. (2001) J Bacteriol 183(8):2425-2430) und *Klebsiella* sp. Strain 25 LX3 (GenBank Acc.-No.: AY040843; Zhang et al. (2002) Appl Environ Microbiol (68):2676-2682).

WO 01/59136 beschreibt Verfahren zur direkten Herstellung nicht-kariogener Zucker direkt in transgenen Pflanzen, die rekombinante 30 Nukleinsäuremoleküle kodierend für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Saccharoseisomerase enthalten. Beschrieben sind Expressionskonstrukte für besagte Saccharoseisomerase zur Expression in Pflanzen, sowie die mit denselben transformierten transgenen Pflanzen.

35

WO 01/59135 beschreibt Verfahren zur Beeinflussung der Pollenentwicklung unter Verwendung von antheren-, tapetum oder pollenspezifisch exprimierten Saccharoseisomerasen. Die konstitutive Expression der Saccharoseisomerase in Pflanzen hat jedoch nach-40 teilige Wirkung auf das Wachstum der Pflanze (Börnke F et al. (2002) Planta 214:356-364).

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel 45 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Oft sind die natürlichen Abwehr-

mechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken.

5 Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV Promoters (Vaeck et al. (1987) *Nature* 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters

10 (Broglie et al. (1991) *Science* 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

15 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogenen Botenstoffen wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) *Plant Cell* 3:1085-1094; Uknas, et al. (1992) *Plant Cell* 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-25 S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) *Plant J* 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) *Plant J.* 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

30 In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispielweise gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büsches R et al. (1997) *Cell* 88:695-705; Jorgensen JH (1977) *Euphytica* 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) *Plant Pathol* 44:786-790). Das Mlo-Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büsches R et al. (1997) *Cell* :695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) *Trends Plant Sci.* 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung von Mlo-Genen zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Unklar ist, ob ein Mlo-basierter Ansatz auch in dikotylenen Pflanzen praktikabel ist.

Generell leben pflanzenpathogene Pilzarten saprophytisch oder parasitisch. Letztere sind - zumindest in bestimmten Phasen ihres Lebenszyklus - auf ein Wirkstoffangebot (z.B. ein Angebot an Vitaminen, Kohlenhydraten usw.) angewiesen, wie es in dieser Form 5 nur von lebenden Pflanzenzellen bereitgestellt werden kann. Der Fachmann unterscheidet parasitäre Pilze in nekrotrophe, hemibiotrophe und biotrophe. Bei nekrotrophen pilzlichen Parasiten führt die Infektion zur Gewebezerstörung und damit zum Tod der Pflanze. Diese Pilze sind meist nur fakultativ parasitär; sie können sich 10 ebenso gut saprophytisch in totem oder absterbendem Pflanzenmaterial vermehren.

Biotrophe pilzliche Parasiten sind dadurch charakterisiert, dass Parasit und Wirt, zumindest über längere Zeiträume hinweg, 15 zusammenleben. Der Pilz entnimmt dem Wirt Nährstoffe, tötet ihn jedoch nicht ab. Die meisten biotrophen Pilze sind obligate Parasiten. Hemibiotrophe Pilze leben zeitweise biotroph und töten den Wirt zu einem späteren Zeitpunkt ab, d.h. sie wechseln in eine nekrotrophe Phase.

20 Einer weitere große Gruppe biotropher pflanzlicher Pathogene von enormer agro-ökonomischer Bedeutung stellen Nematoden dar. Pflanzenpathogene Nematoden entnehmen ihre Nahrung aus den äußeren pflanzlichen Gewebeabschnitten (Ektoparasiten) oder nach 25 dem Eindringen in die Pflanze aus tiefer liegenden Zellschichten (Endoparasiten). Bei den endoparasitären Wurzelnematoden unterscheidet man nach ihrer Lebens- und Ernährungsweisen zwischen zwei Gruppen: Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) und Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten). Bei 30 beiden Gruppen handelt es sich um obligate biotrophe Parasiten, die in den Wurzeln die Bildung spezieller Nährzellen induzieren. Bei diesen Nährzellen handelt es sich um Pflanzenzellen, deren Stoffwechsel von den Nematoden so verändert wurde, dass sie gezielt der Ernährung der sich entwickelten Nematoden dienen. Endoparasitäre Wurzelnematoden sind in ihrer Entwicklung von diesen Nährzellen absolut abhängig (zur Übersicht siehe Sijmons et al. 35 (1994) Ann. Rev. Phytopathol. 32: 235-259). Zystenbildende Nematoden (Heterodera- und Globodera-Arten) verbleiben an der Parasitierungsstelle in der Wurzel (sessile Endoparasiten) 40 wandeln die sie umgebenden Zellen durch Protoplastenfusion bei teilweiser Zellwandauflösung in Syncytien um. Diesen Nährzellen, die im Zentralzylinder der Wurzel gebildet werden, entnehmen die Nematoden ihre Nahrung und schwellen dabei stark an. Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-Arten) verbleiben ebenfalls an der 45 einmal gewählten Parasitierungsstelle und veranlassen die Bildung von Nährzellen, welche aber, anders als bei den Zystenbildenden Nematoden aus mehreren, durch synchrone Kernteilungen ohne Zell-

wandbildung sich entwickelnden vielkernigen Riesenzellen bestehen (Fenoll and Del Campo (1998) *Physiol. Mol. Biol. Plants* 4:9-18). Die Bildung der Nährzellensysteme wird durch die Signalmoleküle im Speichel der Nematoden induziert. Es ist bekannt, dass während 5 dieser Differenzierungsprozesse eine Reihe von Pflanzengenen ihr Expressionsprofil stark verändern. In der Literatur sind Promotoren beschrieben, die speziell in Nährzellsystem (Syncytien) induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen der Δ 0.3 TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) *Science* 263:221-223, 10 der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Ecobar et al. (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 440-449), sowie Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832).

WO 94/10320 beschreibt DNA Konstrukte zur Expression von Genen, 15 die als Inhibitoren endogener Pflanzengene wirken (z.B. ATP Synthase, Cytochrom C, Pyruvatkinase), unter der Kontrolle von Nematoden-induzierter Promotoren in den Syncytien.

Trotz einiger Fortschritte in manchen Bereichen der Pflanzen- 20 biotechnologie, sind die Erfolge beim Erzielen einer Pathogenresistenz in Pflanzen sehr begrenzt und bislang nur gegen Viren hinreichend belegt. Insbesondere Ernteverluste infolge von Pilz- und Nematodenbefall stellen ein ernstzunehmendes Problem dar und erfordern nach wie vor den intensiven Einsatz von Fungiziden und 25 Nematoziden. Dennoch sind die damit zusammenhängenden Probleme nur unzureichend in den Griff zu bekommen.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Ver- 30 fahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrums von Pathogenen, bevorzugt von Pilzen und Nematoden, in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

35 Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

40 a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und

b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle pflanzlichen Organismen angewendet werden, die Saccharose produzieren. Dazu zählen alle höheren Pflanzen. Es wurde überraschender Weise beobachtet, dass auf Kartoffelscheiben transgener Kartoffelpflanzen, in deren Knollen aufgrund transgener Expression einer 10 Saccharoseisomerase Saccharose in Palatinose umgewandelt wird, das Wachstum des Pilzes *Alternaria* signifikant gehemmt ist.

Ferner kann beobachtet werden, dass die transgene Expression der Saccharoseisomerase auch eine Resistenz gegen Nematoden bewirkt. 15 Insbesondere eine durch endoparasitären Wurzelnematoden hervorgerufene Syncitien-spezifische Expression der Saccharoseisomerase-sequenz bewirkt eine deutliche Reduktion des Nematodenbefalls.

Da zahlreiche Pathogene, insbesondere Pilze und Nematoden, Palatinose nicht verstoffwechseln können, ist eine Überwindung der 20 Resistenz durch einfache Mutation in den Pathogenen kaum möglich, da hierfür die Gewinnung einer neuen Enzymaktivität erforderlich wäre.

25 "Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität" meint im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Protein, das als "wesentliche Eigenschaft" die Isomerisierung von Saccharose zu anderen Disacchariden katalysiert, wobei die $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ -glykosidische Bindung zwischen Glukose und Fruktose in der Saccharose in eine andere 30 glykosidische Bindung zwischen zwei Monosaccharideinheiten überführt wird, insbesondere in eine $\alpha 1 \rightarrow \alpha 6$ -Bindung und/oder einer $\alpha 1 \rightarrow \alpha 1$ -Bindung.

Eine Saccharoseisomerase-Aktivität kann indirekt über die 35 Analyse der resultierenden Kohlenhydrate (z.B. Palatinosegehalt) in der dem Fachmann geläufigen Weise beispielsweise durch Analyse ethanolischer Extrakte entsprechenden biologischen Materials (z.B. Material einer transgenen Pflanze oder eines Mikroorganismus) gemessen werden. Besagte Extrakte können z.B. 40 durch HPLC analysiert und die Zucker anhand der entsprechenden Standards identifiziert werden. Ein Verfahren zur Analyse ist z.B. in WO 01/59136 beschrieben. So werden zum Nachweis von Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzenextrakten Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,8 cm für 2 h bei 70°C mit 100 μ l 45 80 % Ethanol und 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,5) extrahiert. Für die Analyse eines Aliquots dieser Extrakte kann ein HPLC-System z.B. der Firma Dionex verwendet werden, welches mit einer PA-1 (4 x

250 mm) -Säule und einen gepulsten elektrochemischen Detektor ausgestattet werden kann. Vor der Injektion können die Proben für 2 Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert werden. Die Zucker können anschließend mit einem 10 minütigen Gradienten von 0 bis 1 5 M Natriumacetat nach 4 Minuten bei 150 mM NaOH und einer Durchflussrate von 1 ml/min eluiert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung der Zucker können die entsprechenden Standards der Firma Sigma verwendet werden.

10 Besonders bevorzugt wird unter einem Protein mit Saccharose-isomerase Aktivität ein Protein verstanden, das als wesentliche Eigenschaft zur Isomerisierung von Saccharose zu Palatinose und/oder Trehalulose befähigt ist. Dabei beträgt der Anteil von Palatinose und Trehalulose an den gesamten Disacchariden, die 15 durch Isomerisierung von Saccharose gebildet werden mindestens 2 %, bevorzugt mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 50 % und am meisten bevorzugt mindestens 60 %.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharose-isomerase-Aktivität, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder 20 nach herkömmlichen Verfahren synthetisiert werden.

Beispiele für Organismen, deren Zellen Proteine mit Saccharose-isomerase-Aktivität sowie die dafür kodierende Nukleinsäure-sequenzen enthalten, sind insbesondere Mikroorganismen der 25 Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Insbesondere sind hier folgende Beispiele für solche Mikroorganismen zu nennen:

30 Protaminobacter rubrum (CBS 547, 77), Erwinia rhabontici (NCPPB 1578), Serratia plymuthica (ATCC 15928), Serratia marcescens (NCIB 8285), Leuconostoc mesenteroides NRRL B-52 If (ATCC 1083 0a). Pseudomonas mesoacidophila MX-45 (FERM 11808 bzw. FERM BP 3619), Agrobacterium radiobacter MX-232 (FERM 12397 bzw. FERM BP 35 3620), Klebsiella subspezies und Enterobacter spezies.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure-sequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharose-isomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine 40 mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- i) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 und

ii) Nukleinsäuresequenzen kodierend ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 und

5 iii) Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionell äquivalente Fragmente zu einem Protein gemäß i) und ii).

Weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodieren, sind im Stand der Technik bekannt 10 und stehen dem Fachmann somit für den Transfer auf Pflanzenzellen zur Verfügung. So sind z.B. Sequenzen aus *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhabontici*, *Enterobacter species SZ 62* und *Pseudomonas mesoacidophila MX-45* in WO 95/20047 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldung wird hiermit ausdrücklich 15 Bezug genommen, sowohl hinsichtlich der offenbarten Sequenzen selbst, als auch im Hinblick auf die Auffindung und Charakterisierung dieser und weiterer Saccharoseisomerase kodierender Sequenzen aus anderen Quellen.

20 Weitere für Saccharoseisomerasen kodierende DNA-Sequenzen kann der Fachmann u.a. den Gendatenbanken unter Verwendung geeigneter Suchprofile und Computerprogramme für das Durchmustern nach homologen Sequenzen bzw. für Sequenzvergleiche entnehmen. Darüber hinaus kann der Fachmann weitere Saccharoseisomerase kodierende 25 Nukleinsäuresequenzen aus anderen Organismen mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann z.B. geeignete Hybridisierungssonden von den bekannten Saccharoseisomerase-Sequenzen ableiten und für das Durchmustern 30 von cDNA-und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, aus dem ein neues Saccharoseisomerase-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen (siehe z.B. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: 35 A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). Ebenso ist der Fachmann in der Lage, anhand bekannter Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen geeignete - gegebenenfalls degenerierte - Oligonukleotide als Primer für Klonierungen neuer Gene mittels PCR zu synthetisieren 40 und erfolgreich einzusetzen.

Proteine mit Saccharoseisomerase Aktivität sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen kann der Fachmann in der ihm geläufigen Weise unschwer aus solchen Organismen isolieren, in 45 denen solche Aktivitäten detektiert wurden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (z.B. DE 44 14 185). So kann z.B. durch partiellen Verdau von genomischer DNA eines solchen Organismus

(bevorzugt eines Mikroorganismus) und Einbringen der erhaltenen Fragmente in geeignete E.coli-Vektoren und Transformation einer Genbank gewonnen werden, deren Klone genomische Abschnitte zwischen 2 und 15 kb des Spenderorganismus enthalten. Aus E.coli-
5 Zellen, die diese Plasmide tragen, werden durch Plattierung auf McConkey-Palatinosemedium solche ausgewählt, die eine Rotfärbung der Kolonie aufweisen. Die in diesen Zellen enthaltene Plasmid-DNA wird in eine E.coli-Mutante überführt, die auf Galactose als einziger C-Quelle nicht wachsen kann (z.B. ED 8654, Sambrook
10 et al., supra, Seiten A9-A13). Diese transformierte Zelllinie ist zur Identifikation von Palatinoseproduzenten in der wie oben beschrieben hergestellten Genbank aus DNA des Spenderorganismus in der Lage. Zur Identifikation der gesuchten Palatinose-bildenden Klone werden die Zellen der Genbank
15 auf Minimal-Salzmedien mit Galactose und Saccharose vereinzelt und angezogen. Nach Replika-Stempeln der Kolonien auf Platten mit dem gleichen Medium werden die Zellen durch Bedämpfung mit Toluol abgetötet. Anschließend werden Zellen des Screeningstamms als Rasen in Minimalsalz-Weichagar ohne C-Quellenzusatz über
20 die Kolonien der Genbank ausgebracht und bebrütet. Es entsteht signifikantes Wachstum der Zellen des Screeningstamms nur am Ort von Zellen der Genbank, die Palatinose produziert haben. Bei Prüfung der Zellen der Replikakontrolle ergibt sich der Gehalt an Isomerase. Diese so identifizierten E.coli-Klone sind
25 auf Palatinose als einziger C-Quelle im Medium nicht wachstumsfähig, zeigen im Test der ganzen Zellen oder in Zellextrakten keine Fähigkeit zur Spaltung von Saccharose, bilden aber unter diesen Bedingungen und ohne Zusatz von Saccharose zum Medium bei der Anzucht Palatinose.

30 Alternativ können Isomerase-Klone auch unter Verwendung eines PCR-Fragments identifiziert werden. Verwendet man Plasmid-DNA den so identifizierten E.coli-Klonen als Sonden zur Hybridisierung an Filtern mit immobilisierter DNA aus dem
35 Spenderorganismus, lassen sich die Genbereiche, die Isomerase-gene tragen, nachweisen und gezielt verfügbar machen.

Funktionelle Äquivalente der im Rahmen dieser Erfindung offebarten Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität umfassen
40 bevorzugt solche aus anderen Organismen, beispielsweise aus Mikroorganismen, deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen Protaminobacter, Erwinia, Serratia, Leuconostoc, Pseudomonas, Agrobacterium, Klebsiella und Enterobacter. Diese können z.B.
45 durch Datenbanksuche in Sequenzdatenbanken wie GenBank oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Banken - z.B. unter Verwendung der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder eines Teils derselben als

Suchsequenz bzw. Sonde - aufgefunden werden. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

- 5 So kann der Fachmann, falls erwünscht, zusätzlich mittels Routinetchniken, verschiedenartige Mutationen in die die Saccharoseisomerase kodierende DNA-Sequenz einführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. So ist es z.B. möglich, gezielt
- 10 Enzyme herzustellen, die durch Addition entsprechender Signalsequenzen in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle lokalisiert sind. Derartige Sequenzen sind in der Literatur beschrieben und dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Braun et al. (1992) EMBO J 11:3219-3227; Wolter F et al. (1988) Proc Natl Acad 15 Sci USA 85:846-850; Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1:95-106).

Weiterhin ist auch die Einführung von Punktmutationen an Positionen denkbar, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielsweise auf die Enzymaktivität 20 oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr den normalerweise in der Zelle herrschenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen. Des weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat-25 oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-, Temperatur- und/oder pH-Profil aufweisen.

Die Degeneration des genetischen Codes bietet dem Fachmann u.a. 30 die Möglichkeit, die Nukleotidsequenz der DNA-Sequenz an die Codonpräferenz ("codon usage") der Zielpflanze, also der aufgrund der Expression der Saccharoseisomerase-Nukleinsäuresequenz pathogenresistenten Pflanze bzw. Pflanzenzelle, anzupassen und die Expression dadurch zu optimieren.

35 Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-40 Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al. (1989), vide supra) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente - wo erforderlich - Adapter oder Linker angefügt 45 werden. Ferner können mittels enzymatischer und anderer Manipulationen passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung gestellt oder überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen

10

entfernt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse und 5 weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt
10 mindestens 90 % zu einer der Polypeptidsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 60 Aminosäuren besonders bevorzugt mindestens 90 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge eines
15 der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver-
20 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

25 Gap Weight: 8 Length Weight: 3

Average Match: 2,912 - Average Mismatch: 2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von 30 mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

35 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 40 %, besonders bevorzugt mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu einer der Nukleinsäuresequenzen mit der SEQ ID NO: 1, 3, 40 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 haben. Dabei erstreckt sich die Homologie über mindestens 100 Basen, bevorzugt mindestens 200 Basen besonders bevorzugt mindestens 300 Basen, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

11

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die jeweilige Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0,

5 University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50

Length Weight: 3

10

Average Match: 10

Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz

15 SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

20 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vor-
25 genannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Saacharoseisomerase aufweisen.

30 "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989),
35 6.3.1-6.3.6.) beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und 40 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben 45 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung 5 und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- 10 a) 4X SSC bei 65°C,
- b) 6X SSC bei 45°C,
- c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
- f) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C,
- 15 h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

(2) Waschschrifte können zum Beispiel aus nachfolgenden 20 Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
- 25 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure-30 sesequenz kodierend für ein Protein mit einer Saccharoseisomerase-Aktivität, Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Saccharoseisomerase-Aktivität kodierend, wobei die Nukleinsäuren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus

- 35 a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22, und
- b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer Homologie von mindestens 40 % zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 aufweisen, und
- 40 c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21, und
- 45 d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degeneriert ist, und

e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40 % zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 aufweisen, und

5 f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 hybridisieren,

sowie funktionell äquivalenten Fragmenten der vorgenannten.

10

Funktionell äquivalente Fragmente meint in Bezug auf ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität bzw. eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine solche, all solche Polypeptide bzw. für diese kodierenden Nukleinsäuresequenzen, die gegenüber ihrer Ausgangs-
15 sequenz eine Verkürzung am 5'- und/oder 3'-Ende und/oder eine oder mehrere Deletionen aufweisen, aber nach wie vor über eine Saccharoseisomerase-Aktivität verfügen, bzw. für ein Protein mit derselben kodieren. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende
20 Deletion vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz die Synthese entsprechend verkürzter Proteine erreicht werden kann.

Wie oben erwähnt, können die kodierenden Sequenzen für Saccha-
25 roseisomerasen auch durch Signalsequenzen ergänzt sein, die für den Transport des Genprodukts, also vorliegend des Proteins mit Saccharoseisomerase-Aktivität, zu einem bestimmten Kompartiment sorgen.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sorgen Signal-sequenzen dafür, dass die Saccharoseisomerase in die Zellwand bzw. den Apoplasten der transformierten Pflanzenzellen trans- portiert wird, d.h. die transformierten Pflanzen exprimieren eine chimäre Saccharoseisomerase, die ein Signalpeptid für den Trans-
35 port in das Endoplasmatische Retikulum umfasst. Geeignete Signal- sequenzen, die die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum gewährleisten, kann der Fachmann der einschlägigen Literatur entnehmen. Besonders geeignet ist z.B. die für das Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus Kartoffel kodierende
40 Sequenz (Keil et al. (1996) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Gen- bank Accession No. X04118). Andere geeignete Signalsequenzen sorgen z.B. für die Aufnahme der Saccharoseisomerase in die Vakuole. Hier ist als Beispiel das Signalpeptid des Patatin-Gens aus Kartoffel (Sonnewald U et al. (1991) Plant J 1(1):95-106) zu
45 nennen.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung der Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

10 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein oder mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders 20 bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 25 90 % oder 95 % vermindert.

"Auswahl" umfasst in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

40 "Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Pilze, pilzhähnliche Pathogene (wie beispielsweise Chromista; z.B. Oomyceten) sowie tierische Schädlinge wie beispielsweise Nematoden. Besonders bevorzugt sind Nematoden und Pilze. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Expression eines 45 Saccharoseisomerase-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene:

5

Pilzpathogene und pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) umfassen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze und stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend *Plasmodiophora*-*mycota*, *Oomycota*, *Ascomycota*, *Chytridiomyceten*, *Zygomyceten*,

10

Basidiomycota und *Deuteromyceten* (*Fungi imperfecti*). Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15 Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i>
Spelzenbräune	<i>Septoria nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium</i> spp.
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora</i> <i>herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago</i> spp.
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthrocnoise leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> <i>Politis</i>); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
Anthracnose stalk rot	
Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>

Erkrankung	Pathogen
Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
5 Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Coch- liobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (tele- omorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuber- culata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
10	
15 Didymella leaf spot	Didymella exitalis
Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
20 Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seed- ling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodialeaf macrospora

Tabelle 2: Falscher Mehltau (Oomyceten)

Erkrankung	Pathogen
Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zae
30 Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
Green ear downy mi- ldew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
35 Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
40 Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
45 Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)

Erkrankung	Pathogen
5 Ear rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i>), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
10	
15 Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
20 Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
Fusarium ear and stalk rot	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
25 Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
Fusarium stalk rot, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)
30 25 Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	<i>Gibberella zeae</i> (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
Gray ear rot	<i>Botryosphaeria zeae</i> = <i>Physalospora zeae</i> (anamorph: <i>Macrophoma zeae</i>)
35 Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. zeae-maydis</i>
Helminthosporium root rot	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

Erkrankung	Pathogen
Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiophaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zaeae, S. zeicola, S. zeina
Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helmin- thosporium turcicum)
Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
Phaeocytostroma stalk rot and root rot	Phaeocytostroma ambiguum, = Phaeocy- sporella zaeae
Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
Pyrenopeziza stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenopeziza terrestris
Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes,
Pythium stalk rot	P. graminicola
Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Pythium aphanidermatum =
Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	P. butleri L. Epicoccum nigrum
Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae	

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
10		
15	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
20	Rust, common corn	Puccinia sorghi
	Rust, southern corn	Puccinia polysora
	Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zae = Angiopsora zae
25	Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
	Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zae (anamorph: F. graminearum), Macrohomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
30		
	Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
	Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
	Shuck rot	Myrothecium gramineum
35	Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
	Smut, common	Ustilago zae = U. maydis
	Smut, false	Ustilaginoidea virens
	Smut, head	Sphaelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
40	Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
	Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematoxocca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zaeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
15	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zaeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zaeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerotophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gräsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotium (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Septoria nodorum und 5 Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Tierische Schädlinge

Als tierische Schädlinge sind insbesondere Nematoden bevorzugt. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten 15 Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Parasitäre Nematoden

	Schädigung	Pathogene Nematode
20	Awl	Dolichodorus spp., D. heterocephalus
	Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	Ditylenchus dipsaci
25	Burrowing	Radopholus similis
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zae, Punctodera chalcoensis
	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
30	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
35	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zae
	Needle	Longidorus spp., L. brevianulatus
	Ring	Criconemella spp., C. ornata
40	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
45	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Rade-krankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Pilzpathogene erzielt:

- 15 1. Gerste: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (Barley Powdery Mildew).
- 20 2. Sojabohne: *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Phomopsis *sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, *Glomerella glycines*, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium solani*.
- 30 3. Canola: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassiccola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.
- 35 4. Alfalfa: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregularare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila medicaginis*, *Fusarium*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.
- 45 5. Weizen: *Urocystis agropyri*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotrichum graminicola*,

Erysiphe graminis f.sp. tritici, Puccinia graminis f.sp. tritici, Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia striiformis, Pyrenophora tritici-repentis, Septoria nodorum, Septoria tritici, Septoria avenae, Pseudocercospora herpotrichoides,

5 Rhizoctonia solani, Rhizoctonia cerealis, Gaeumannomyces graminis var. tritici, Pythium aphanidermatum, Pythium arrhenomanes, Pythium ultimum, Bipolaris sorokiniana, Claviceps purpurea, Tilletia tritici, Tilletia laevis, Ustilago tritici, Tilletia indica, Rhizoctonia solani,

10 Pythium arrhenomanes, Pythium gramicola, Pythium aphanidermatum, Puccinia graminis f.sp. tritici (Wheat stem rust), Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici (Wheat Powdery Mildew)

15 6. Sonnenblume: Plasmophora halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alternaria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macrohomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae, Rhizopus arrhizus, Rhizopus 20 stolonifer, Puccinia helianthi, Verticillium dahliae, Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo tragopogonis.

7. Mais: Fusarium moniliforme var. subglutinans, Fusarium 25 moniliforme, Gibberella zae (Fusarium graminearum), Stenocarpella maydi (Diplodia maydis), Pythium irregularare, Pythium debaryanum, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum, Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis O, T (Cochliobolus heterostrophus), 30 Helminthosporium carbonum I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I, II & III, Helminthosporium pedicellatum, Physoderma maydis, Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi, Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macrohomina phaseolina, 35 Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae, Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inaequalis, Curvularia pallens, Trichoderma viride, Claviceps sorghi, Cornstunt spiroplasma, Diplodia macrospora, Sclerotinia macrospora, Peronosclerospora sorghi, Peronosclerospora 40 philippensis, Peronosclerospora maydis, Peronosclerospora sacchari, Spacelotheca reiliana, Physopella zae, Cephalosporium maydis, Cephalosporium acremonium.

8. Sorghum: Exserohilum turcicum, Colletotrichum graminicola 45 (Glomerella graminicola), Cercospora sorghi, Gloeocercospora sorghi, Ascochyta sorghina, Puccinia purpurea, Macrohomina phaseolina, Perconia circinata, Fusarium monilifonne, Alter-

5 *naria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerotophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

10

Bevorzugt wird in den einzelnen Pflanzenarten eine Resistenz gegen nachfolgende beispielhaft genannte Nematodenpathogene erzielt:

15	Zucker- rübe	Zuckerrübenzystenälchen (Sugar beet cyst nematode)	<i>Heterodera schachtii</i>
20	Kartoffel	Columbia Wurzelgal- lenälchen (Columbia Root- knot Nematode)	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>
25		Golden Nematode	<i>Globodera rostochiensis</i>
		Nördliches Wurzelgal- lenälchen (Northern Root Knot Nema- tode)	<i>Meloidogyne hapla</i>
30	Sojabohne	Potato Rot Nematode	<i>Ditylenchus destructor</i>
35	Mais	Sojabohnezystenälchen (Soybean cyst nematode; SCN)	<i>Heterodera glycines</i>
		Maiszystenälchen (Corn Cyst Nematode)	<i>Heterodera zeae</i>
		Wurzelgallenälchen (Root-Knot Nematodes)	<i>Meloidogyne species:</i> <i>Meloidogyne arenaria</i> <i>Meloidogyne graminicola</i> <i>Meloidogyne chitwoodi</i> <i>Meloidogyne hapla</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Meloidogyne javanica</i>

40 "Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, 45 Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits

des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und 5 Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen 10 Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

15

"Pflanze" umfasst alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, 20 Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Laetula, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, 25 Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, 30 Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiate, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanacea, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

35

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr 40 sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

5

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

10 - Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,

- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv

15 Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,

20

- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

25 - Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,

30 - Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine), und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Paprika) sowie Tabak und andere mehr,

35 - Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakaostrauch) und andere mehr,

40 - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,

- Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie)) und andere mehr,

45

sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

5 Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae 10 wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

15 20 Am meisten bevorzugt sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen, die von Natur aus einen hohen Anteil an Saccharose aufweisen oder deren Wurzeln, Knollen oder Speicherwurzeln wirtschaftlich verwertet werden, wie z.B. Kartoffel, Rübe oder Zuckerrübe. Ebenfalls bevorzugt sind Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, 25 Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja sowie Getreidearten wie Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais. Am meisten bevorzugt sind Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

30 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen Expressionskonstrukte zur Expression von Proteinen mit Saccharoseisomerase-Aktivität in Pflanzen zum Einsatz. Derartige Expressionskassetten sind beispielsweise in WO 01/59136 und WO 01/59135 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

35 40 45 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für ein Protein mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder eines funktionellen Äquivalentes desselben oder eines funktionell äquivalenten Teils der vorgenannten) bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine transgene Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben gewährleistet.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel der Sequenz

gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines Expressionskonstrukt kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymschnittstellen, einer att-Sequenz für Rekombinasen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einem Expressionskonstrukt sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für das Proteins mit Saccharosisomerase-Aktivität (z.B. kodiert durch SEQ ID NO: 2 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten) - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - so hinter einen endogenen pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die transgene Expression der besagten Nukleinsäuresequenz gewährleistet.

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass

5 die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe oder Organ, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In Bezug auf die zu transformierende Pflanze kann

10 der Promotor homolog oder heterolog sein. Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

15 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor

20 oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-No. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-

25 Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der

30 Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fach-

35 mann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus A. thaliana (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

b) Gewebespezifische Promotoren.

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Blätter, Stengel, Wurzeln oder Samen.

5

Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53; z.B. aus Phaseolus vulgaris; van der Geest et al. (1996) Plant Mol Biol 32:579-588), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-467; Phillips et al. (1997) EMBO J 16:4489-4496), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), der Hordein-Promotor (Brandt et al. (1985) Carlsberg Res. Commun. 50:333-345) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128; Bäumlein H et al. (1992) Plant J 2(2):233-239; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980).

Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase), der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, der Promotor der Stärkesynthase oder anderer Stärke bildender/modifizierender Enzyme wie z.B. Promotoren von Genen die für Verzweigungsenzyme kodieren (WO 92/14827, WO 92/11375). Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO 89/03887.

- Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- 45 Besonders bevorzugt ist dabei der B33-Promotor des Klasse I Patatin-Gens aus Solanum tuberosum (Rocha-Sosa et al.

(1989) EMBO J 8:23-29). Der Promotor des Klasse I Patatin-Gens ist in Knollen ca. 100 bis 1000 mal aktiver als in Blättern (Rocha-Sosa et al., vide supra). Weitere Gene mit knollenspezifischer oder zumindest in Knollen verstärkter Expression sind bekannt (z.B. der Promotor der ADP-Glukose-Pyrophosphorylase-Gene; Müller et al. (1990) Mol Gen Genet 224:136-146).

5 - Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase; US 4,962,028) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind epidermispezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol Biol 36:101-112).

10 c) Chemisch induzierbare Promotoren

15 Die transgenen Expressionskonstrukte können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der 20 Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure 25 induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetra- 30 zyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

35 d) Entwicklungsabhängige Promotoren

40 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Frucht- 45 reifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

e) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. 1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor.

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968 (1989)).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498; EP-A 375 091), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Besonders bevorzugt sind Promotoren, die speziell in Nährzellsystemen (Syncytien) nach Nematodenbefall induziert werden. Beispielhaft seien zu nennen

- 40 i) der Δ 0.3 TobRB7 Promotor aus Tabak (Opperman et al. (1994) Science 263: 221-223), insbesondere der durch SEQ ID NO: 24 beschriebene Promotor,
- 45 ii) der Lemmi9 Promotor aus Tomate (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449), insbesondere der durch SEQ ID NO: 23 beschriebene Promotor, sowie

iii) Geminivirus V-sense Promotoren (WO 00/01832), insbesondere die durch SEQ ID NO: 32, 33 oder 34 beschriebenen Promotoren.

5 Besonders bevorzugt sind pathogen- oder stress-induzierbare, sowie Samen-, Knolle-, Wurzel-, Blatt- und/oder Stengel-spezifische, insbesondere epidermis-spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbare und epidermis-spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

10 Ein weiterer - besonders bevorzugter - Gegenstand der Erfindung betrifft Expressionskonstrukte, in denen eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase Aktivität in funktioneller Verknüpfung mit einem stress-, pathogen-, oder 15 verwundungs-induzierbaren Promotor steht. Stress-, pathogen oder verwundungs-induzierbare Promotoren meint allgemein all solche Promotoren, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden können. Abiotischer Stress meint dabei Stimuli wie Hitze, Kälte, Trockenheit, Frost, Feuchte, Salz, UV-Licht 20 usw. Biotischer Stress meint dabei den Befall durch ein Pathogen, wobei der Begriff "Pathogen" all die oben genannten Pathogene umfasst. Dabei hat der Stimulus bevorzugt eine Stärke, die zu einem Ertragsrückgang von mindestens 5 % im Vergleich zu durchschnittlichen Ertragswerten führt. Induzierbar meint dabei eine 25 Erhöhung der Transkriptionsaktivität um mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 100 %, besonders bevorzugt mindestens 500 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000 %, am meisten bevorzugt mindestens 5000 % im Vergleich zu der Expressionsaktivität einer nicht-stimulierten Pflanze. Stress- oder pathogen-induzierbare 30 Promotoren umfassen beispielhaft, jedoch nicht einschränkend den pathogen-induzierbaren Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), den hitzeinduzierbaren hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), den kälteinduzierbaren α -Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), den licht-35 induzierbaren PPDK Promotor oder den verwundungs-induzierbaren pinII-Promoter (EP-A 0 375 091). Bevorzugt sind insbesondere pathogen-induzierbare Promotoren wie z.B. die Promotoren der PR-Proteine, SAR-Proteine, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; 40 Uknes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; 45 Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968). Umfasst

sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1- und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol 5 Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen. Verwundungs-induzierbare Promoto- 10 ren sind bei Befall durch Fraßpathogene vorteilhaft einzusetzen.

Der Durchschnittsfachmann kann darüber hinaus ohne weiteres zusätzliche Beispiele für Gene mit stress-, pathogen- oder verwundungs-induzierten Expressionsmustern der Literatur ent- 15 nehmen. Ferner ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger molekular- biologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien entsprechende regulatorische Nuklein- 20 säurelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt eine differentielle Expressionsbibliothek von beispiels- weise pathogen-infizierten/befallenen und "normalem" Geweben angelegt. Anschließend werden mit Hilfe der so identifizierten pathogen-induzierten cDNAs Promotoren isoliert, die über patho- 25 gen-induzierbare regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter stress-, pathogen- oder verwundungs- induzierter Promotoren zur Verfügung.

30 Besonders bevorzugt sind gewebespezifische Promotoren, insbesondere samenspezifische, knollenspezifische, fruchtspezifische und blattspezifische Promotoren sowie pathogen-induzierte Promotoren.

Ganz besonders bevorzugt sind pathogeninduzierte Promotoren, 35 insbesondere Nematoden-induzierte Promotoren.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder 40 in anderen Organismen, wie zum Beispiel E.coli Bakterien ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den Expressionskonstrukten oder Expressionsektoren ent- 45 haltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit

zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion eines Expressionskonstruktes haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen 5 oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die Expressionskonstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzen-spezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls 10 weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressions-15 teuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH (1991) J Biol Chem 20 266(26):17131- 17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von 25 Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde 30 gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene 40 Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer 45 oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens umfassen. Beispiele für besonders geeignete 5 Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines 10 Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine Saccharoseisomerase kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden.

15 Ein transgenes Expressionskonstrukt und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss 20 auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

25 a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide z.B. Metabolismusinhibitoren (wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika (wie z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin) oder Herbizide (wie Glyphosat oder Phosphinotricin) verleihen.

30 Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche, die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren 35 inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine 40 Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonlurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (spt) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin 45 gewährt, das Neomycinphosphotransferase (nptII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticin (G418) verleiht, das

Hygromycinphosphotransferase (hpt) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (als), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

5

b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-
10 ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

15

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft als ORI ("origin of DNA replication") seien genannt der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

20

d) Elemente, die für eine Agrobakterium-vermittelte Pflanzen-
30 transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

Die Einführung eines erfindungsgemäßen Expressionskonstruktes in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressions-

konstrukte enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Das transgene Expressionskonstrukt kann in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle oder 5 eine Rekombinase att-Sequenz eingeführt werden. Der entstandene transgene Expressionsvektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit den dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können 10 dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration des transgenen Expressionskonstruktes in das pflanzliche Genom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer 15 transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung 20 (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch 25 Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen 30 Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 35 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229- 1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) 40 Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation 45 genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte

"particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

5 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind bei-
10 spielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist das transgene Expressionskonstrukt in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in
15 einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit dem einzuführenden
20 transgenen Expressionskonstrukt verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen für die
25 Selektion transformierter Pflanzen (z.B. das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht) und einen Linker oder Poly-linker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Außerhalb der T-DNA-Begrenzungssequenz enthalten sie zudem noch einen Selektionsmarker, der eine Selektion transformierter E.coli und/oder Agrobakteria ermöglicht (z.B. das nptIII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht). Entsprechende Vektoren können direkt in Agrobakterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187).

35 Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Ver-
40 wendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommer-
45 ziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen werden keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache

5 Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es vorteilhaft, wenn sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

10 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen

15 Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen

20 untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht,

25 oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr

30 Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic

35 Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225. Vorzugsweise wird das Expressionskonstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren,

40 beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann be-
45 kannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise

42

induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, 5 Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11:567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

10

"Transgen" meint alle solche Konstruktionen und Verfahren, in denen sich entweder

- 15 a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Protein mit Saccharoseisomerase-Aktivität, oder
- b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- 20 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei 25 die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek.

30

35

40

45

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 5 2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum*
- 10 3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (N-terminales Fragment)
- 15 4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (N-terminales Fragment)
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonthici*
- 20 6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonthici*
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
- 25 8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Protaminobacter rubrum* (Variante)
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 30 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Enterobacter species SZ62*
- 35 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Serratia plymuthica*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharose-isomerase aus *Serratia plymuthica*
- 40 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonthici* (*palI*) und Signalpeptidsequenz des Proteinase Inhibitor II Gens

14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für Fusionsprotein aus Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabontici* (*palI*) und Signalpeptidsequenz des Proteinase Inhibitor II Gens

5 15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz (vollständige cDNA mit untranslatierter Region) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus Klebsiella sp. LX3

10 16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus Klebsiella sp. LX3

15 17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz (offenes Leseraster) kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus Klebsiella sp. LX3

20 18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase (Isomaltulosesynthase) aus Klebsiella sp. LX3

25 19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)

30 20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Enterobacter* species SZ62 (Fragment)

35 21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)

40 22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für Saccharoseisomerase aus *Pseudomonas mesoacidophila* MX45 (Fragment)

23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicum esculatum*)

45 24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz kodierend für $\Delta 0.3$ TobRB7 Promotorsequenz (Region: -298 bis +76) aus *Nicotiana tabacum*

45

25. SEQ ID NO: 25 Oligonukleotidprimer FB83
5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3'

5. 26. SEQ ID NO: 26 Oligonukleotidprimer FB84
5'-GTCGACGTCTGCCAAAAACCTT-3'

10 27. SEQ ID NO: 27 Oligonukleotidprimer FB 97
5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3'

15 28. SEQ ID NO: 28 Oligonukleotidprimer Lem1
5'-atcGAATTCTATAATTAAACCATCTAGAG-3'

20 29. SEQ ID NO: 29 Oligonukleotidprimer Lem2
5'-atcGGTACCTGCTCTGGAACGAAAGGG-3'

25 30. SEQ ID NO: 30 Oligonukleotidprimer Tob1
5'-GGAATTCAAGCTTATCTAAACAAAGTTTAAATTC-3'

30 31. SEQ ID NO: 31 Oligonukleotidprimer Tob2
5'-GGGTACCAAGTTCTCACTAGAAAAATGCC-3'

35 32. SEQ ID NO: 32 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Wheat Dwarf Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006849; Sequenz 1 aus WO 00/01832)

40 33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Maize Streak Virus (GenBank Acc.-
No.: AX006850; Sequenz 2 aus WO 00/01832)

45 34. SEQ ID NO: 34 Nukleinsäuresequenz kodierend für V-sense
Promotor aus Pepper huasteco Virus (GenBank
Acc.-No.: AX006851; Sequenz 3 aus WO 00/01832)

35

40

45

Abbildungen

1. Fig. 1: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
5 35S: 35S Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) Promotor
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
10 Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
2. Fig 2: Schematische Darstellung der Expressionskassette im Plasmid pB33-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
15 B33: Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
palI: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.
20
3. Fig. 3: Westernblot-Analyse von palI exprimierenden Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien. Pro Spur wurden 20 µg lösliches Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen, getrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Filter wurden anschließend mit einem polyklonalen PalI Antikörper hybridisiert. Verglichen wurde die Expression in Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen (wt) mit der in den Kartoffellinien 5, 25 12, 26 und 33.
30
4. Fig. 4: HPLC-Analyse der löslichen Kohlenhydrate in Saccharoseisomerase exprimierenden Pflanzen.
A: Zuckerstandards.
B: Extrakt einer transgenen Knolle.
C: Extrakt einer Wildtypknolle.
35
5. Fig. 5: Gehalt an Palatinose, Saccharose, Glucose und Stärke in Wildtyp-Kartoffelknollen (wt) und Kartoffelknollen verschiedener transgener Linien (3 bis 37), die das chimäre palI Gen in der Zellwand exprimieren. Die Werte des Wiltyps (wt; gestreifte Säulen) und der transgenen Kartoffelknollen (3 bis 37; schwarze Säulen) entsprechen den Mittelwerten von vier Messungen ± Standardabweichung. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine transgene jedoch palI nicht-exprimierende Linie (Control) analysiert.
40
45

6. Fig.6: Infektion von Kartoffelknollen mit *Alternaria solani*.
Kartoffelscheiben von Wildtyp-Knollen und Knollen der *pali*
exprimierenden transgene Linien 5 und 33 zum Zeitpunkt
14 Tage nach Infektion mit *Alternaria solani*.

5 A: Kontrolle mit Kartoffelscheiben von Wildtyp (wt)- und
transgenen Knollen (Linien 5 und 33) nach 14-tägiger
Inkubation ohne vorherige *Alternaria* Infektion.

B: Wildtypknollen; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

C: Transgene Linie-5; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

10 D: Transgene Linie-33; 14 Tage nach *Alternaria* Infektion

7. Fig. 7: Schematische Darstellung der Expressionskassette
im Plasmid pLemmi9-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
15 Lemmi9: Lemmi9-Promotor aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*)
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
pali: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

20 8. Fig 8: Schematische Darstellung der Expressionskassette
im Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso. Bedeutung der Abkürzungen:
Δ0.3TobRB: Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*
SP: Signalpeptid des Proteinase-Inhibitor II-Gens
25 pali: Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*
OCS: Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens
EcoRI, Asp718, BamHI, SalI, HindIII: Restriktionschnittstellen
Detaillierte Beschreibung der einzelnen Elemente siehe unten.

30 Beispiele

Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,
35 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet,
2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die
im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungs-
schritte - wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektro-
phorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren
40 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Frag-
menten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien,
Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA -
werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor
Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhrte.

45 Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entspre-
chend der Methode von Hofgen und Willmitzer ((1988) Nucl. Acids
Res. 16:9877) ausgeführt. Die Anzucht der *Agrobacterien* erfolgte

in YEB Medium (Vervliet et al. (1975) Gen Virol 26:33). Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad 5 Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: PCR-Amplifikation eines Subfragments der Saccharose-isomerase aus *Erwinia rhabonitici*

10 Die Klonierung eines Subfragments der Saccharoseisomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente genomische DNA aus *E. rhabonitici* (DSM 4484), die nach Standardprotokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der nach-15 folgenden spezifischen Primer, die von einer Saccharoseisomerase-Sequenz des Standes der Technik abgeleitet wurden:

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAGCAATCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB84 5'-GTCGACGTCTGCCAAAACCTT-3' (SEQ ID NO: 26)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB84 die Basen 1289 bis 1306 der kodierenden Region des Saccharose-isomerase-Gens von *E. rhabonitici*.

25

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomal Bakterien DNA (1 µg)
- Primer FB 83 und FB 84 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

35 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (2 Minuten). Das erhaltene Fragment wurde in den Vektor pCR-Blunt 40 (Invitrogen) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert.

45 Das amplifizierte Subfragment kann auch als Hybridisierungssonde für die Isolierung weiterer Saccharoseisomerase-DNA-Sequenzen aus anderen Organismen oder als Sonde bei der Analyse transgener Zellen und Pflanzen eingesetzt werden.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation einer Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhabonitici*

Unter Verwendung des in Beispiel 1 amplifizierten Fragmentes
5 wurde eine genomische Bank von *Erwinia rhabonitici* nach Standard-
methoden durchmustert. Anschließende Sequenzanalysen erlaubten
die Bestimmung des offenen Leserahmens der Saccharoseisomerase.
Von dieser Sequenz wurden die Oligonukleotidprimer FB83 und FB97
abgeleitet.

10

Die Klonierung des vollständigen offenen Leserasters der
Saccharose-Isomerase erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion
(Polymerase Chain Reaction, PCR). Als Matrizenmaterial diente
genomische DNA aus *E. rhabonitici* (DSM 4484), die nach Standard-
15 protokoll isoliert wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter Ver-
wendung der nachfolgenden spezifischen Primer

FB83 5'-GGATCCGGTACCGTTCAAGCAAAT-3' (SEQ ID NO: 25)

20 FB97 5'-GTCGACCTACGTGATTAAGTTTATA-3' (SEQ ID NO: 27)

Primer FB83 umfaßt die Basen 109 bis 127 und Primer FB97 die
Basen 1786 bis 1803 der kodierenden Region des Saccharose-
isomerase-Gens. Zur Klonierung der amplifizierten DNA in
25 Expressionsvektoren tragen die Primer zusätzlich folgende
Restriktionschnittstellen: Primer FB 83, BamHI und Primer FB 97,
SalI.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

30

- chromosomale Bakterien-DNA (1 µg),
- Primer FB83 und FB97 jeweils 250 ng,
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 35 - 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min
auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden
in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem
40 Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung
der Primer bei 55°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C
(2 Minuten). Das amplifizierte Saccharoseisomerase-Fragment
wurde in den Vektor pCR-Blunt (Invitrogen) kloniert, wodurch
das Plasmid pCR-SucIso2 (ohne Translationsstart) erhalten wurde.
45 Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse
verifiziert. Das PCR-Fragment beinhaltet somit die Sequenz einer

Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici*, die sich von Nukleotid 109-1803 des Saccharoseisomerase-Gens erstreckt.

Beispiel 3: Herstellung von Plasmid p35S-cwIso

5

Eine DNA Sequenz, die für eine Saccharose-Isomerase kodiert, wurde aus dem Plasmid pCR-SucIso2 isoliert und mit dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzenzellen vermittelt sowie

10 einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens.

Vor die kodierende Sequenz des Saccharoseisomerase-Gens wurde 15 außerdem ein für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Gens (Proteinase-Inhibitor II-Gen aus Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.-No.: X04118) fusioniert. Dazu wurde das Saccharoseisomerase-Fragment aus dem Konstrukt pCR-SucIso2 20 über die Restriktionsschnittstellen BamHI und SalI herausgeschnitten und in einen BamHI/SalI-geöffneten pMA-Vektor ligiert. Der Vektor pMA stellt eine modifizierte Form des Vektors pBINAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) dar. Welche den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus, der eine konstitutive Expression in transgenen Pflanzen vermittelt, ein Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II aus Kartoffel, welches die Zielsteuerung des Fusionsproteins in die Zellwand vermittelt, sowie ein pflanzliches Terminationssignal enthält. Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase Gens. Zwischen der Teilsequenz des Proteinase-Inhibitors und dem Terminationssignal befinden sich 25 Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, XbaI, SalI, PstI und SphI (in dieser Reihenfolge), welche die Insertion entsprechender DNA-Fragmente ermöglichen, so dass ein Fusionsprotein zwischen dem Proteinase-Inhibitor Signalpeptid und dem eingefügten Protein entsteht, welches dann in die Zellwand von transgenen Pflanzenzellen befördert wird, die dieses Protein exprimieren. Die Expressionskassette im Plasmid p35S-cwIso besteht somit aus den Fragmenten A, B und C (Fig. 1):

30

A) Fragment A beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV). Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV umfaßt (Franck (1980) Cell 21:285).

45

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al., supra), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase Gen aus *Erwinia rhabontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfaßt, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) notwendige Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase Sequenz fusioniert.

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J. 2:419-426. GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In p35S-cwIso (35S = 35S-Promotor, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici* unter konstitutiver Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen und anschließend sekretiert.

20

Beispiel 4: Herstellung von Plasmid pB33-cwIso

Das Plasmid pB33-cwIso wurde unter Verwendung des binären Plasmids p35S-cwIso hergestellt. Dabei wurde der 35S-Promoter gegen den Promotor des Klasse I Patatin-Gens (Rocha-Sosa et al (1989) EMBO J 8:23-29) ausgetauscht. Die Expressionskassette dieses Plasmids pB33-cwIso besteht somit aus den drei Fragmenten A, B und C (siehe Fig. 2):

A) Fragment A beinhaltet die Region -1512 bis +14 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle des Klasse I Patatin-Gens. Die Promotorregion wurde als DraI-Fragment in den mit SstI geschnittenen Vektor pUC18, dessen Enden unter Einsatz der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und somit geglättet worden waren, ligiert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 aus dem Vektor pUC18 wieder ausgeschnitten und in das Plasmid p35S-cwIso kloniert, aus dem vorher der 35S CaMV-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert worden war.

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel, welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhabontici*, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges

Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426; GenBank Acc.-No.: Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In pB33-cwIso (B33 = Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region der Saccharoseisomerase aus *E. rhabontici* unter gewebe-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

Beispiel 5: Kartoffeltransformation und Selektion transgener Pflanzen

20 kleine, mit einem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Solara) wurden in 10 ml MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 5-minütigem, leichtem Schütteln wurden die Petrischalen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 2 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 500 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurde die Claforankonzentration im Medium halbiert. Eine weitere Woche Kultivierung erfolgte unter bekannten Bedingungen (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J 8:23-29).

30 Unter Verwendung des pB33-cwIso Plasmids wurden nach Agrobakterien-vermittelter Transformation insgesamt 36 kanamycin-resistente Kartoffelpflanzen regeneriert. Die Knollen dieser Pflanzen wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das rekombinante PalI Protein (Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364) auf palI Expression untersucht. Bei 25 Linien konnte palI Expression im Westernblot nachgewiesen werden. Ein Westernblot von repräsentativen Linien ist in Fig. 3 dargestellt.

40 Beispiel 6: HPLC-Analyse der transgenen pB33-cwIso-Kartoffeln

Mit dem Ziel des Nachweises der in vivo Konversion von Saccharose in Palatinose wurden Knollenextrakte der transgenen Linien mittels HPLC hinsichtlich ihres Gehaltes an löslichen Kohlenhydraten untersucht. Die HPLC Analyse wurde nach der in Börnke et al. (2002) Planta 214:356-364 beschrieben Methode durchgeführt. Die Herstellung der Knollen Extrakte ist beschrieben

bei Sonnewald et al. (1992) Plant J 2:571-581. Die Resultate der HPLC Analyse sind in Fig. 4 dargestellt.

Wie die Chromatogramme zeigen, führt die Expression der Saccharoseisomerase in der Zellwand zu einer substantiellen Akkumulation von Palatinose in den Knollen der untersuchten pB33-cwIso-Linien. Der Wildtyp enthält keine Palatinose, wie ebenfalls aus den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist. Der Gehalt an löslichen Zuckern in transgenen Kartoffelknollen, die das Konstrukt pB33-cwIso enthalten, ist in Fig. 5 dargestellt. Der Gehalt an Palatinose in den Kartoffelknollen variiert zwischen den einzelnen transgenen Linien zwischen 1,7 µmol/g FW (FW: "fresh weight" = Frischgewicht) (Linie 14) und 16 µmol/g FW (Linie 5).

15

Beispiel 7: Infektion von Kartoffelscheiben mit *Alternaria solani*

Alternaria solani (bereitgestellt von Dr. Jürgen Sigrist, Zentrum für Grüne Gentechnik, Neustadt an der Weinstraße) wurden auf PDA-Agar (Duchefa, Niederlande) für 14 Tage bei 16°C gehalten (PDA = Potato Dextrose Agar). Die Sporen wurden durch Abschaben in Wasser isoliert und die erhaltene Suspension durch Miracloth von festen Bestandteilen befreit. Die Sporeanzahl wurde in einer Zählkammer (Thoma) bestimmt und auf 10000 Sporen/ml eingestellt. 25 25 µl (demnach 250 Sporen) wurden pro Kartoffelscheibe (1,5 cm Durchmesser) aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die inokulierten Scheiben wurden anschließend bei 16°C inkubiert. Die Bonitur erfolgte optisch. Das Ergebnis nach 14-tägiger Inkubation ist in Fig. 6 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, ist 30 das Wachstum des Pilzes auf transgenen Kartoffelknollen, die die Saccharoseisomerase exprimieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert.

35

Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids pLemmi9-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den Lemmi9 Promotor Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:440-449) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-40 Inhibitor II-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter die Kontrolle des "Feeding cell"-spezifischen Promotor gestellt.

Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Lemmi9-Promotors wurde bereits demonstriert (Escobar C et al. (1999) 45 Mol Plant Microbe Interact 12:440-449). Das Plasmid pLemmi9-cwIso beinhaltet drei Fragmente A, B und C (siehe Fig. 7):

A) Fragment A beinhaltet den Lemmi9-Promotor aus Tomate (Lycopersicon esculentum). Das Fragment beinhaltet die Sequenz von 1417 bp vor dem Translationsstart (ATG) des Lemmi9-Gens und wurde als funktionelles Promoterfragment charakterisiert (Escobar et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 440-449, Accession Z69032). Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von Tomate (Lycopersicon esculentum) amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

10

Lem1: 5'atcGAATTCTATAATTTAACCATCTAGAG 3' (SEQ ID NO: 28)

Lem2: 5'atcGGTACCTGCTTCTGGAACGAAAGGG 3' (SEQ ID NO: 29)

15

Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Lem1, EcoRI; Primer Lem2, Asp718.

20

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

25

- genomische Tomaten-DNA (1 µg),
- Primer Lem1 und Lem2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

30

Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten). Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktionschnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach partieller Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

40

45

B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 des Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl Acids Res 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche über einen Linker mit der Sequenz ACC GAA TTG GG an das Saccharoseisomerase-Gen aus *E. rhabontici*, welches die

Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch ist ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

5

C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

10 In pLemmi9-cwIso (Lemmi9 = Promotor des Lemmi9-Gens aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*), cw = Zellwand, Iso = Saccharose-isomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter Feeding cell-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

15 Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pLemmi9-cwIso transformiert und ganze Kartoffelpflanzen wurden regeneriert.

20 Beispiel 9: Herstellung des Plasmids pΔ0.3TobRB7-cwIso

Zur Herstellung des Plasmids pΔ0.3TobRB7-cwIso wurde der Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 im Plasmid pB33-cwIso gegen den 25 Δ0.3TobRB7 Promotor (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223) ausgetauscht und das Fusionsprotein aus Proteinase-Inhibitor-Signalpeptid und der Saccharoseisomerase somit unter Feeding cell-spezifische Kontrolle gestellt.

30 Die Funktionalität des "Feeding cell"-spezifischen Δ0.3TobRB7-Promotors wurde bereits demonstriert (Opperman et al. (1994) Science 263:221-223). Das pflanzliche Terminationssignal beinhaltet das 3'-Ende der Polyadenylierungsstelle des Octopin-Synthase-Gens. Das Plasmid pΔ0.3TobRB7-cwIso beinhaltet drei 35 Fragmente A, B und C (Fig. 8):

40 A) Fragment A beinhaltet den Δ0.3TobRB7-Promotor aus *Nicotiana tabacum*. Das Fragment beinhaltet die Region von -298 bp bis +76 des TobBR7-Gens befinden und als funktionelles Promotor-fragment charakterisiert wurden (Opperman et al. (1994) Science. 263: 221-223, Acc.-No.: S45406) . Es wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* Var. Samsun NN amplifiziert. Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der folgenden spezifischen Primer:

45

Tob1: 5' -GGAATTCAGCTTATCTAACAAAGTTTAAATTC-3' (SEQ ID NO: 30)

Tob2: 5'-GGGTACCAAGTCTCACTAGAAAAATGCC-3' (SEQ ID NO: 31)

5 Zur Klonierung der DNA in die Expressionskassette tragen die Primer zusätzlich folgende Restriktionsschnittstellen: Primer Tob1, EcoRI; Primer Tob2, Asp718.

Das PCR-Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt:

10 - genomische DNA aus Tabak (1 µg),
- Primer Tob1 und Tob2 (jeweils 250 ng),
- Pfu DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 µl, Stratagene),
- 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und
- 2,5 Einheiten Pfu DNA-Polymerase (Stratagene).

15 Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde das Gemisch für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Polymerisierungsschritte (30 Zyklen) wurden in einem automatischen T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 95°C (1 Minute), Anlagerung der Primer bei 20 56°C (40 Sekunden), Polymerase-Reaktion bei 72°C (3 Minuten).

Das Amplikon wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in die entsprechenden Restriktions-25 schnittstellen des Polylinkers von pBluescript (Stratagene) kloniert. Die Identität der amplifizierten DNA wurde mittels Sequenzanalyse verifiziert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Asp718 verdaut und in das Plasmid pB33-cwIso kloniert aus dem vorher der B33-Promotor nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und Asp718 deletiert wurde.

30 B) Fragment B enthält die Nukleotide 923 bis 1059 eines Proteinase-Inhibitor II-Gens aus der Kartoffel (Keil et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:5641-5650; Genbank Acc.No.: X04118), welche an das Saccharoseisomerase-Gen aus E. rhapontici, welches die Nukleotide 109 bis 1803 umfasst, fusioniert sind. Dadurch wird ein für die Aufnahme von Proteinen in das ER notwendiges Signalpeptid eines pflanzlichen Proteins N-terminal an die Saccharoseisomerase-Sequenz fusioniert.

40 C) Fragment C enthält das Polyadenylierungssignal des Octopin-Synthase Gens (Dhaese et al. (1983) EMBO J 2:419-426. Accession Z37515, Nukleotide 1344 bis 1533).

In pΔ0.3TobRB7-cwIso (Δ0.3TobRB7 = verkürzter Promotor des TobRB7-Gens aus Tabak, cw = Zellwand, Iso = Saccharoseisomerase) steht die kodierende Region des Saccharoseisomerase-Gens unter

"Feeding cell"-spezifischer Kontrolle, das Genprodukt wird in das ER aufgenommen.

Kartoffelzellen wurden wie oben beschrieben mittels

5 Agrobacterium-vermitteltem Gentransfer mit dem Konstrukt pΔ0.3TobRB7-cwIso transformiert und Kartoffelpflanzen wurden regeneriert

Beispiel 10: Infektion der Pflanzen mit Nematoden

10

Transformierte Pflanzen werden mit Hilfe von npt-spezifischen Primern über PCR bestätigt. Zur Infektion mit Nematoden werden die Stecklinge von transgenen Linien, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zuerst auf Medium mit Kanamycin angezogen und später in Töpfe mit steriler Erde transferiert. Die Pflanzen werden bei 22°C (16 h Tag/8 h Nacht) angezogen. Die Infektion der Pflanzen wird wie folgt durchgeführt: 3 ml einer Suspension (ca. 500 J2-Larven) von Wurzelgallennematoden (Meloidogyne-15 Arten) werden direkt neben den Stengeln der Pflanzen in die Erde inokuliert. Die Pflanzen werden nach 2 bis 3 Wochen aus den Töpfen entfernt und die Wurzeln gewaschen. Anschließend wird die gesamte Wurzel einer jeden Pflanze mit Hilfe eines Stereomikroskopes untersucht und die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem 20 von transgenen Pflanzen und Wildtyppflanzen verglichen.

Transgene Pflanzen, die die Saccharoseisomerase unter Kontrolle eines „Feeding cell“-spezifischen Promotors exprimieren, zeigen eine deutliche Resistenz gegenüber endoparasitären Wurzel-30 nematoden. Die Anzahl der Gallen am Wurzelsystem dieser Pflanzen nach Nematodenbefall ist im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen signifikant reduziert.

35

40

45

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch - bevorzugt pathogen-induzierbare - Expression einer Saccharoseisomerase.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
5 mindestens ein Pathogen in pflanzlichen Organismen, wobei
nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) transgene Expression eines Proteins mit Saccharoseisomerase Aktivität in einem pflanzlichen Organismus oder
10 einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, und
 - b) Auswahl der pflanzlichen Organismen, bei denen
- im Unterschied oder Vergleich zum Ausgangsorganismus -
15 die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht
oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Saccharose-Isomerase
beschrieben wird durch
20 i) ein Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder
18, oder
ii) ein funktionelles Äquivalent zu einem Protein gemäß
SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18, oder
25 iii) ein funktionell äquivalentes Fragment zu einem Protein
gemäß i) und ii).
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die
30 Expression der Saccharoseisomerase gewährleistet wird durch
eine transgene Expressionskassette umfassend mindestens eine
Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Aminosäuresequenz
35 gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder
22, und
 - b) Nukleinsäuresequenzen kodierend für Proteine mit einer
40 Homologie von mindestens 40% zu der Sequenz gemäß
SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22
aufweisen, und
 - c) Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,
45 13, 15, 17, 19 oder 21, und

- d) Nukleinsäuresequenzen, die zu einer Nukleinsäuresequenz von c) degeneriert ist, und
- 5 e) Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 40% zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 aufweisen, und
- 10 f) Nukleinsäuresequenzen, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 hybridisieren.
- 15 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Saccharose-Isomerase unter Kontrolle eines in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder gewebespezifischen Promotors exprimiert wird.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pilzen und Nematoden.
- 25 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 30 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zuckerrübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
- 35 8. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen funktionellen pathogen-induzierbaren oder epidermis-spezifischen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodieren für eine Saccharose-Isomerase.
- 40 9. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8, wobei die Saccharoseisomerase wie in einem der Ansprüche 2 oder 3 definiert ist.
- 45 10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 8 oder 9, wobei der pathogen-induzierbare oder epidermis-spezifische Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 23, 24, 32, 33 oder 34.

11. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10.
12. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 11.
13. Transgener Organismus nach Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Kartoffel, Rübe, Zucker-
10 rübe, Tomate, Banane, Karotte, Zuckerrohr, Erdbeere, Ananas, Papaya, Soja, Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Triticale, Hirse und Mais.
14. Transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 12 bis 13.
15. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 12 bis 13 oder von diesem angeleitete transgene Ernteprodukte, Vermehrungsmaterial, Zellen, Organe, Teile, Kalli, Zellkulturen, Samen, Knollen, Stecklinge oder transgene Nachkommen nach Anspruch 14 zur Herstellung von Palatinose.

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KGaA

<120> Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in
Pflanzen

<130> AE 20020427

<140>

<141>

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1890

<212> DNA

<213> *Protaminobacter rubrum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1887)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 1

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca	48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	

tca tta tgc atc tca tgc cag caa gcc ttc ggt acg caa caa ccc ttg	96
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	

aag gag gct gtt tat cag gtg tat ccg cgc tcc ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	

aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	

tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	

gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	

atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	

gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	

cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Lys	
145 150 155 160	

gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	

cag	gct	cct	aat	aat	tac	cct	tca	ttc	ttt	ggt	ggc	tcg	gct	tgg	caa	576		
Gln	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln			
180								185					190					
aaa	gat	gaa	aag	acc	aat	caa	tac	tac	ctg	cac	tat	ttt	gct	aaa	caa	624		
Lys	Asp	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln			
195							200					205						
cag	cct	gac	cta	aac	tgg	gat	aat	ccc	aaa	gtc	cgt	caa	gat	ctt	tat	672		
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr			
210							215					220						
gca	atg	tta	cgt	ttc	tgg	tta	gat	aaa	ggc	gtg	tct	ggt	tta	cgt	ttt	720		
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe			
225							230					235			240			
gat	acg	gta	gct	acc	tac	tca	aaa	att	ccg	gat	ttc	cca	aat	ctc	acc	768		
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr			
							245					250			255			
caa	caa	cag	ctg	aag	aat	ttt	gca	gct	gag	tat	acc	aag	ggc	cct	aat	816		
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Asn			
							260					265			270			
att	cat	cgt	tac	gtc	aat	gaa	atg	aat	aaa	gag	gtc	ttg	tct	cat	tac	864		
Ile	His	Arg	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr			
							275					280			285			
gac	att	gct	act	gcc	ggt	gaa	atc	ttt	ggc	gta	ccc	ttg	gat	caa	tcg	912		
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Ser			
							290					295			300			
ata	aag	ttc	tcc	gat	cgc	cgc	cgt	gat	gag	ctg	aac	att	gca	ttt	acc	960		
Ile	Lys	Phe	Phe	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Ala	Phe	Thr			
							305					310			315		320	
ttt	gac	tta	atc	aga	ctc	gat	cga	gac	tct	gat	caa	aga	tgg	cgt	cga	1008		
Phe	Asp	Leu	Ile	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp	Ser	Asp	Gln	Arg	Trp	Arg	Arg			
							325					330			335			
aaa	gat	tgg	aaa	ttg	tcg	caa	ttc	cg	cag	atc	atc	gat	aac	gtt	gac	1056		
Lys	Asp	Trp	Lys	Leu	Ser	Gln	Phe	Arg	Gln	Ile	Ile	Asp	Asn	Val	Asp			
							340					345			350			
cgt	act	gca	gga	gaa	tat	ggt	tgg	aat	gcc	ttc	ttc	ttg	gat	aac	cac	1104		
Arg	Thr	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly	Trp	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Asp	Asn	His			
							355					360			365			
gac	aat	ccg	cgc	gct	gtc	tcg	cac	ttt	ggc	gat	gat	gat	cgc	cca	caa	1152		
Asp	Asn	Pro	Arg	Ala	Val	Ser	His	Phe	Gly	Asp	Asp	Asp	Arg	Pro	Gln			
							370					375			380			
tgg	cgt	gag	cca	tcg	gct	aaa	gct	ttt	gca	acc	ttg	acg	ctg	act	caa	1200		
Trp	Arg	Glu	Pro	Ser	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln			
							385					390			395		400	
cga	gca	aca	cct	ttt	att	tat	caa	ggt	tca	gaa	ttg	ggc	atg	acc	aat	1248		
Arg	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Gly	Met	Thr	Asn			
							405					410			415			
tac	ccg	ttt	aaa	gct	att	gat	gaa	ttc	gat	gat	att	gag	gtg	aaa	ggt	1296		
Tyr	Pro	Phe	Lys	Ala	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Val	Lys	Gly			
							420					425			430			
ttt	tgg	cat	gac	tac	gtt	gag	aca	gga	aag	gtc	aaa	gcc	gac	gag	ttc	1344		
Phe	Trp	His	Asp	Tyr	Val	Glu	Thr	Gly	Lys	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Phe			
							435					440			445			

ttg caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc	450	455	460	1392
Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe				
caa tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg	465	470	475	1440
Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp				
ttc aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc	485	490	495	1488
Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val				
aca caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata	500	505	510	1536
Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile				
agg cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat	515	520	525	1584
Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp				
cct gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa	530	535	540	1632
Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu				
aaa tat ctt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa	545	550	555	1680
Lys Tyr Leu Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys				
tta ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc	565	570	575	1728
Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser				
aaa aac gtg gtg aaa aag aat gat tca tta ctc gag cta aaa cca tgg	580	585	590	1776
Lys Asn Val Val Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp				
cag tca ggg gtt tat aaa act aaa tca ata aat ctc ata gtc acg cca	595	600	605	1824
Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro				
aat aat gta aat ata ttg aaa cta tta aaa ccg gca ttt tat gcc ggt	610	615	620	1872
Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly				
ttt ttt agc gca aaa tag	625			1890
Phe Phe Ser Ala Lys				
<210> 2				
<211> 629				
<212> PRT				
<213> Protaminobacter rubrum				
<400> 2				
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	1	5	10	15
Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu	20	25	30	
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	35	40	45	
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	50	55	60	
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	65	70	75	80

Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
130 135 140

His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys
145 150 155 160

Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly
165 170 175

Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
180 185 190

Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
210 215 220

Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
225 230 235 240

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
245 250 255

Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
260 265 270

Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr
275 280 285

Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
290 295 300

Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
325 330 335

Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Asp Arg Pro Gln
370 375 380

Trp Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln
385 390 395 400

Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn
405 410 415

Tyr Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly
420 425 430

Phe Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe
435 440 445

Leu Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe
450 455 460

Gln Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp
 465 470 475 480
 Phe Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val
 485 490 495
 Thr Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile
 500 505 510
 Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp
 515 520 525
 Pro Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu
 530 535 540
 Lys Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys
 545 550 555 560
 Leu Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser
 565 570 575
 Lys Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp
 580 585 590
 Gln Ser Gly Val Tyr Lys Thr Lys Ser Ile Asn Leu Ile Val Thr Pro
 595 600 605
 Asn Asn Val Asn Ile Leu Lys Leu Leu Lys Pro Ala Phe Tyr Ala Gly
 610 615 620
 Phe Phe Ser Ala Lys
 625

<210> 3
 <211> 1305
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhabontici
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1305)
 <223> coding for N-terminal fragment of sucrose
 isomerase
 <400> 3
 atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct ntc gct att ttt ctt gca acc 48
 Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc nnn cca gat acc 96
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr
 20 25 30
 gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
 35 40 45
 aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 65 70 75 80
 tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac 288
 Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95

gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser	
245 250 255	
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys	
260 265 270	
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser	
290 295 300	
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp	
340 345 350	
caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	1104
Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	

gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt	1200
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg caa gac	1305
Trp Gln Asp	
435	
<210> 4	
<211> 435	
<212> PRT	
<213> Erwinia rhabontici	
<400> 4	
Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Xaa Ala Ile Phe Leu Ala Thr	
1 5 10 15	
Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Xaa Pro Asp Thr	
20 25 30	
Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp	
35 40 45	
Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp	
65 70 75 80	
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn	
130 135 140	
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys	
145 150 155 160	
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly	
165 170 175	
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu	
180 185 190	
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser
 245 250 255
 Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys
 260 265 270
 Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
 275 280 285
 Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser
 290 295 300
 Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg
 325 330 335
 Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp
 340 345 350
 Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp
 435

<210> 5
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> Erwinia rhabontici

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1800)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 5
 atg tcc tct caa gga ttg aaa acg gct gtc gct att ttt ctt gca acc 48
 Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 act ttt tct gcc aca tcc tat cag gcc tgc agt gcc ggg cca gat acc 96
 Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
 20 25 30
 gcc ccc tca ctc acc gtt cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg 144
 Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
 35 40 45
 aag cag gct gtt ttt tat cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg 192
 Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 aat ggg gat ggc att ggg gat tta aac ggt att att gag aat tta gac 240
 Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
 65 70 75 80

tat ctg aag aaa ctg ggt att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac	85	90	95	288
Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr				
gat tcg ccg aat acg gat aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag	100	105	110	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys				
ata atg aaa gaa tac ggt acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca	115	120	125	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser				
gaa atg aag aaa cgc aat atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac	130	135	140	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn				
cac acc agc gat cag cat gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag	145	150	155	480
His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys				
aac aac ccc tac agg gac tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc	165	170	175	528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly				
cat gcc ccc aat aac tat ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa	180	185	190	576
His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu				
aaa gac gat aaa tca ggc cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag	195	200	205	624
Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln				
caa ccc gac ctc aac tgg gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat	210	215	220	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr				
gac atg ctc cgc ttc tgg tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt	225	230	235	720
Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe				
gat acc gtt gcc acc tac tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc	245	250	255	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser				
caa cag cag tta aaa aat ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa	260	265	270	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys				
att cac gac tac gtg aat gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat	275	280	285	864
Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr				
gat atc gcc act gcg ggg gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg	290	295	300	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser				
att aag ttt ttc gat cgc cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg	305	310	315	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr				
ttt gat ctg atc agg ctc gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga	325	330	335	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg				
aaa gac tgg acc ctt tcg cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac	340	345	350	1056
Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp				

caa acg gca gga gag tat ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac	355	360	365	1104
'Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His				
gac aat ccc cgc gcg gtt tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg	370	375	380	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp				
cgc gag cat gcg gcg aaa gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt	385	390	395	1200
Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg				
gca acg ccg ttt atc tat cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat	405	410	415	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr				
ccc ttt aaa aaa atc gat gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt	420	425	430	1296
Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe				
tgg caa gac tac gtt gaa aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt	435	440	445	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu				
caa aac gta cgc caa acc agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag	450	455	460	1392
Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln				
tgg gat gca agc aaa aac gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta	465	470	475	1440
Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu				
aaa atc aat ccc aat tat aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat	485	490	495	1488
Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn				
aat cca aat tcc gta ttt aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc	500	505	510	1536
Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg				
cat gac atc cct gcc ttg acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct	515	520	525	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro				
gac aac aat tca gtc tat gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa	530	535	540	1632
Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys				
tat ctt gtg gtc att aat ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg	545	550	555	1680
Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu				
ccc ggg gat tta tcc atc aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac	565	570	575	1728
Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His				
act att gtg aat aaa aat gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag	580	585	590	1776
Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln				
tcg ggc att tat aaa ctt aat ccg tag	595	600		1803
Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro				
<210> 6				
<211> 600				

<212> PRT

<213> Erwinia rhabontici

<400> 6

Met Ser Ser Gln Gly Leu Lys Thr Ala Val Ala Ile Phe Leu Ala Thr
1 5 10 15

Thr Phe Ser Ala Thr Ser Tyr Gln Ala Cys Ser Ala Gly Pro Asp Thr
20 25 30

Ala Pro Ser Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp
35 40 45

Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
50 55 60

Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys
100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser
115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn
130 135 140

His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys
145 150 155 160

Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly
165 170 175

His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu
180 185 190

Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln
195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
210 215 220

Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
225 230 235 240

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser
245 250 255

Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys
260 265 270

Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
275 280 285

Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser
290 295 300

Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg
325 330 335

Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp
340 345 350

12

Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Glu Phe Leu
 435 440 445
 Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu
 465 470 475 480
 Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn
 485 490 495
 Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg
 500 505 510
 His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His
 565 570 575
 Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln
 580 585 590
 Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro
 595 600

<210> 7
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> Protaminobacter rubrum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1800)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 7
 atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca 48
 Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr
 1 5 10 15
 tca tta tgc atc tca tgc cag caa gcc ttc ggt acg caa caa ccc ttg 96
 Ser Leu Cys Ile Ser Cys Gln Gln Ala Phe Gly Thr Gln Gln Pro Leu
 20 25 30

ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct ttt tat cag gtg tat ccg cgc tcc ttt aaa gac acc	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac gga gat ggc atc ggg gat att aac ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Asn Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat cta aaa gcc ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gat tct ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgg aat atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgc ggc tat tat ttc tgg aaa gat gct aaaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aat ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg tta cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgt ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	
gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gat ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gcg gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aaa gag gtc ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Lys Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcg act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	

ata aag ttc ttc gat cgc cgc cgt gat gag ctg aac.att gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gat tgg aaa ttg tcg caa ttc cgg cag atc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gca gga gaa tat ggt tgg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcg cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgt gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca aca cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccg ttt aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtc aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg acg ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat ggg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aac cca aac tac cag gaa atc aat gca gta agt caa gtc aca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr	
485 490 495	
caa ccc gac tca gta ttt aac tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	
cat gac atc ccg gca ctg acc tat ggt aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtt gtt gtt aac ttc aag gag caa atg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu	
545 550 555 560	
ccg gat aat tta tcc att gag aaa gtg att ata gac agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys	
565 570 575	

aac	gtg	gtg	aaa	aag	aat	gat	tca	tta	ctc	gag	cta	aaa	cca	tgg	cag	1776
Asn	Val	Val	Lys	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Leu	Glu	Leu	Lys	Pro	Trp	Gln	
			580					585					590			
tca	ggg	gtt	tat	aaa	cta	aat	caa	taa								1803
Ser	Gly	Val	Tyr	Lys	Leu	Asn	Gln									
			595					600								
<210>	8															
<211>	600															
<212>	PRT															
<213>	Protaminobacter rubrum															
<400>	8															
Met	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Lys	Thr	Ala	Leu	Ala	Ile	Phe	Leu	Thr	Thr	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Cys	Ile	Ser	Cys	Gln	Gln	Ala	Phe	Gly	Thr	Gln	Gln	Pro	Leu	
			20						25					30		
Leu	Asn	Glu	Lys	Ser	Ile	Glu	Gln	Ser	Lys	Thr	Ile	Pro	Lys	Trp	Trp	
			35						40					45		
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Val	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	
			50						55					60		
Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Asn	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	
			65						70			75		80		
Tyr	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	
						85					90			95		
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Arg	Asp	Tyr	Arg	Lys	
						100				105				110		
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	
			115					120					125			
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	
			130					135					140			
His	Thr	Ser	Asp	Gln	Asn	Glu	Trp	Phe	Val	Lys	Ser	Lys	Ser	Ser	Lys	
			145					150			155			160		
Asp	Asn	Pro	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Asp	Ala	Lys	Glu	Gly	
						165			170					175		
Gln	Ala	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln		
						180			185					190		
Lys	Asp	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Lys	Gln	
						195			200					205		
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Gln	Asp	Leu	Tyr	
			210					215			220					
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Arg	Phe	
			225					230			235			240		
Asp	Thr	Val	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Pro	Asn	Leu	Thr	
						245				250				255		
Gln	Gln	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Ala	Ala	Glu	Tyr	Thr	Lys	Gly	Pro	Asn	
						260			265					270		
Ile	His	Arg	Tyr	Val	Asn	Glu	Met	Asn	Lys	Glu	Val	Leu	Ser	His	Tyr	
						275			280					285		
Asp	Ile	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	Ile	Phe	Gly	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Ser	
			290					295					300			

16

Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
 325 330 335
 Lys Asp Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Asp Asn Val Asp
 340 345 350
 Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
 355 360 365
 Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
 370 375 380
 Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
 405 410 415
 Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
 420 425 430
 Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu
 435 440 445
 Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
 450 455 460
 Trp Asp Gly Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe
 465 470 475 480
 Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Thr
 485 490 495
 Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
 500 505 510
 His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
 515 520 525
 Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
 530 535 540
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Gln Met Met Arg Tyr Lys Leu
 545 550 555 560
 Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Asp Ser Asn Ser Lys
 565 570 575
 Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
 580 585 590
 Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
 595 600

<210> 9
 <211> 1794
 <212> DNA
 <213> Enterobacter sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1791)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 9
 atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct 48

Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser	1	5	10	15	
ttg ata ata agt ctg gcc tgc ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg					96
Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu	20	25	30		
aat cag gat att cac gtt caa aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg					144
Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp	35	40	45		
aaa gaa gct gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc					192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	50	55	60		
aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac					240
Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	65	70	75	80	
tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac					288
Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	85	90	95		
gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag					336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln	100	105	110		
ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc					384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala	115	120	125		
gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtc gtc att aac					432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	130	135	140		
cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa					480
His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys	145	150	155	160	
aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat					528
Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn	165	170	175		
cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa					576
Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	180	185	190		
aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag					624
Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	195	200	205		
caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac					672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr	210	215	220		
gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt					720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe	225	230	235	240	
gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca					768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr	245	250	255		
cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggd cct aat					816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Xaa Pro Asn	260	265	270		

att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cg	cg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr		
275 280 285		
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912	
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser		
290 295 300		
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960	
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met		
305 310 315 320		
ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008	
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His		
325 330 335		
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056	
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp		
340 345 350		
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gac aac cat	1104	
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His		
355 360 365		
gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg	1152	
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp		
370 375 380		
cg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg	1200	
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg		
385 390 395 400		
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat	1248	
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr		
405 410 415		
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc	1296	
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe		
420 425 430		
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc	1344	
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu		
435 440 445		
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag	1392	
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln		
450 455 460		
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt	1440	
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe		
465 470 475 480		
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac scc gaa cgc gaa gaa acc	1488	
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Xaa Glu Arg Glu Glu Thr		
485 490 495		
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc	1536	
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg		
500 505 510		
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca	1584	
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro		
515 520 525		
cag gac aat acc gtt tat gcc tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt	1632	
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg		
530 535 540		

tat ctg gtc gtg aac ttt aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc 1680
 Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
 545 550 555 560
 ccg gct aat gat gcc atc gag gaa gtg gtc att gat act cag cag caa 1728
 Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln
 565 570 575
 ggt gcg ccg cac agc aca tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt 1776
 Gly Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly
 580 585 590
 gcg tat aag ctg cgg taa 1794
 Ala Tyr Lys Leu Arg
 595
 <210> 10
 <211> 597
 <212> PRT
 <213> Enterobacter sp.
 <400> 10
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln
 100 105 110
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala
 115 120 125
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys
 145 150 155 160
 Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn
 165 170 175
 Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln
 195 200 205
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe
 225 230 235 240
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255

Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Xaa Pro Asn
260 265 270

Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr
275 280 285

Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser
290 295 300

Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His
325 330 335

Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp
340 345 350

Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His
355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
370 375 380

Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg
385 390 395 400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
405 410 415

Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
420 425 430

Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
435 440 445

Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
450 455 460

Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
465 470 475 480

His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Xaa Glu Arg Glu Glu Thr
485 490 495

Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
500 505 510

His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
515 520 525

Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
530 535 540

Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
545 550 555 560

Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
565 570 575

Gly Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly
580 585 590

Ala Tyr Lys Leu Arg
595

<212> DNA

<213> Serratia plymuthica

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1800)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 11

atg ccc cgt caa gga ttg aaa act gca cta gcg att ttt cta acc aca	48
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	
tca tta agc gtc tca tgc cag caa gcc tta ggt acg caa caa ccc ttg	96
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	
ctt aac gaa aag agt atc gaa cag tcg aaa acc ata cct aaa tgg tgg	144
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
aag gag gct gtt tat cag gtg tat ccg cgt tcc ttt aaa gac act	192
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
aac ggg gat ggt atc ggg gat att aaa ggc atc ata gaa aaa tta gac	240
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
tat tta aaa gct ttg ggg att gat gcc att tgg atc aac cca cat tat	288
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
gac tcc ccg aac acg gat aat ggt tac gat ata cgt gat tat cga aaa	336
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
atc atg aaa gaa tat ggc acg atg gag gat ttt gac cgc ctg att tct	384
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
gaa atg aaa aaa cgt aac atg cgg ttg atg att gat gtg gtc atc aac	432
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
cac acc agc gat caa aac gaa tgg ttt gtt aaa agt aaa agc agt aag	480
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
gat aat cct tat cgt ggc tat tac ttc tgg aaa gat gct aaa gaa ggg	528
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
cag gcg cct aat aat tac cct tca ttc ttt ggt ggc tcg gcg tgg caa	576
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
aaa gat gaa aag acc aat caa tac tac ctg cac tat ttt gct aaa caa	624
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	
cag cct gac cta aac tgg gat aac ccc aaa gtc cgt caa gat ctt tat	672
Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr	
210 215 220	
gca atg ttg cgt ttc tgg tta gat aaa ggc gtg tct ggt tta cgc ttt	720
Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe	
225 230 235 240	

gat acg gta gcg acc tac tca aaa att ccg gac ttc cca aat ctc acc	768
Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr	
245 250 255	
caa caa cag ctg aag aat ttt gca gct gag tat acc aag ggc cct aat	816
Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cgt tac gtc aat gaa atg aat aga gaa gtt ttg tct cat tac	864
Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr	
275 280 285	
gac att gcc act gcc ggt gaa atc ttt ggc gta ccc ttg gat caa tcg	912
Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser	
290 295 300	
ata aaa ttc ttc gat cgc cgt cgc gat gag ctg aac atc gca ttt acc	960
Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr	
305 310 315 320	
ttt gac tta atc aga ctc gat cga gac tct gat caa aga tgg cgt cga	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg	
325 330 335	
aaa gag tgg aaa ttg tcg caa ttc cga cag gtc atc gat aac gtt gac	1056
Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp	
340 345 350	
cgt act gcc ggc gaa tat ggt ttg aat gcc ttc ttc ttg gat aac cac	1104
Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aat ccg cgc gct gtc tcc cac ttt ggc gat gat cgc cca caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgc gag cca tcg gct aaa gcg ctt gca acc ttg acg ctg act caa cga	1200
Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gca acg cct ttt att tat caa ggt tca gaa ttg ggc atg acc aat tac	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc aaa gct att gat gaa ttc gat gat att gag gtg aaa ggt ttt	1296
Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cat gac tac gtt gag aca gga aag gtg aaa gcc gac gag ttc ttg	1344
Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu	
435 440 445	
caa aat gta cgc ctg acg agc agg gat aac agc cgg aca ccg ttc caa	1392
Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg gat acg agc aaa aat gca gga ttc acg agc gga aaa cct tgg ttc	1440
Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
aag gtc aat cca aac tac cag gaa atc aat gcg gta agt caa gtc gca	1488
Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala	
485 490 495	
cag ccc gac tcg gta ttt aat tat tat cgt cag ttg atc aag ata agg	1536
Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg	
500 505 510	

cat aac atc ccg gca ctg acc tat ggc aca tac acc gat ttg gat cct	1584
His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro	
515 520 525	
gca aat gat tcg gtc tac gcc tat aca cgc agc ctt ggg gcg gaa aaa	1632
Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys	
530 535 540	
tat ctt gtt gtc gtt aac ttc cag gaa caa gtg atg aga tat aaa tta	1680
Tyr Leu Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu	
545 550 555 560	
ccg gat aat cta tcc atc gag aaa gtg att ata gaa agc aac agc aaa	1728
Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys	
565 570 575	
aac gtt gtg aaa aag aat gat tcc tta ctc gaa cta aaa cca tgg cag	1776
Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln	
580 585 590	
tca ggg gtt tat aaa cta aat caa taa	1803
Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln	
595 600	
<210> 12	
<211> 600	
<212> PRT	
<213> Serratia plymuthica	
<400> 12	
Met Pro Arg Gln Gly Leu Lys Thr Ala Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr	
1 5 10 15	
Ser Leu Ser Val Ser Cys Gln Gln Ala Leu Gly Thr Gln Gln Pro Leu	
20 25 30	
Leu Asn Glu Lys Ser Ile Glu Gln Ser Lys Thr Ile Pro Lys Trp Trp	
35 40 45	
Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr	
50 55 60	
Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Ile Lys Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp	
65 70 75 80	
Tyr Leu Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr	
85 90 95	
Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys	
100 105 110	
Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser	
115 120 125	
Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn	
130 135 140	
His Thr Ser Asp Gln Asn Glu Trp Phe Val Lys Ser Lys Ser Ser Lys	
145 150 155 160	
Asp Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Tyr Phe Trp Lys Asp Ala Lys Glu Gly	
165 170 175	
Gln Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln	
180 185 190	
Lys Asp Glu Lys Thr Asn Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln	
195 200 205	

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr
210 215 220

Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe
225 230 235 240

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asp Phe Pro Asn Leu Thr
245 250 255

Gln Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Ala Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Asn
260 265 270

Ile His Arg Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr
275 280 285

Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Gln Ser
290 295 300

Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Asp Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asp Gln Arg Trp Arg Arg
325 330 335

Lys Glu Trp Lys Leu Ser Gln Phe Arg Gln Val Ile Asp Asn Val Asp
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His
355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
370 375 380

Arg Glu Pro Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg
385 390 395 400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
405 410 415

Pro Phe Lys Ala Ile Asp Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
420 425 430

Trp His Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala Asp Glu Phe Leu
435 440 445

Gln Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
450 455 460

Trp Asp Thr Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly Lys Pro Trp Phe
465 470 475 480

Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gln Glu Ile Asn Ala Val Ser Gln Val Ala
485 490 495

Gln Pro Asp Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Gln Leu Ile Lys Ile Arg
500 505 510

His Asn Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Thr Tyr Thr Asp Leu Asp Pro
515 520 525

Ala Asn Asp Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Ser Leu Gly Ala Glu Lys
530 535 540

Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Gln Glu Gln Val Met Arg Tyr Lys Leu
545 550 555 560

Pro Asp Asn Leu Ser Ile Glu Lys Val Ile Ile Glu Ser Asn Ser Lys
565 570 575

Asn Val Val Lys Lys Asn Asp Ser Leu Leu Glu Leu Lys Pro Trp Gln
580 585 590

Ser Gly Val Tyr Lys Leu Asn Gln
595 600

<210> 13
<211> 1844
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for fusion-protein of signal peptide from proteinase inhibitor I and Sucrose isomerase from Erwinia rhabdophila
<220>
<221> CDS
<222> (24) .. (1835)
<220>
<221> sig_peptide
<222> (24) .. (143)
<223> signal peptide from proteinase inhibitor I
<220>
<221> misc_feature
<222> (144) .. (1835)
<223> coding for mature peptide of sucrose isomerase from Erwinia rhabdophila (pali)
<400> 13
ggtaccctaa ttaattatcc atc atg gat gtt cac aag gaa gtt'aat ttc gtt 53
Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val
1 5 10
gct tac cta cta att gtt ctt gga tta ttg gta ctt gta agc gcg atg 101
Ala Tyr Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met
15 20 25
gag cat gtt gat gcg aag gct tgc acc gaa ttg ggg atc ctc acc gtt 149
Glu His Val Asp Ala Lys Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val
30 35 40
cag caa tca aat gcc ctg ccc aca tgg tgg aag cag gct gtt ttt tat 197
Gln Gln Ser Asn Ala Leu Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr
45 50 55
cag gta tat cca cgc tca ttt aaa gat acg aat ggg gat ggc att ggg 245
Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly
60 65 70
gat tta aac ggt att att gag aat tta gac tat ctg aag aaa ctg ggt 293
Asp Leu Asn Gly Ile Ile Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly
75 80 85 90
att gat gcg att tgg atc aat cca cat tac gat tcg ccg aat acg gat 341
Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp
95 100 105
aat ggt tat gac atc cgg gat tac cgt aag ata atg aaa gaa tac ggt 389
Asn Gly Tyr Asp Ile Arg Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly
110 115 120
acg atg gaa gac ttt gac cgt ctt att tca gaa atg aag aaa cgc aat 437
Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn
125 130 135

atg cgt ttg atg att gat att gtt atc aac cac acc agc gat cag cat	485
Met Arg Leu Met Ile Asp Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His	
140 145 150	
gcc tgg ttt gtt cag agc aaa tcg ggt aag aac aac ccc tac agg gac	533
Ala Trp Phe Val Gln Ser Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp	
155 160 165 170	
tat tac ttc tgg cgt gac ggt aag gat ggc cat gcc ccc aat aac tat	581
Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn Asn Tyr	
175 180 185	
ccc tcc ttc ttc ggt ggc tca gcc tgg gaa aaa gac gat aaa tca ggc	629
Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys Ser Gly	
190 195 200	
cag tat tac ctc cat tac ttt gcc aaa cag caa ccc gac ctc aac tgg	677
Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp	
205 210 215	
gac aat ccc aaa gtc cgt caa gac ctg tat gac atg ctc cgc ttc tgg	725
Asp Asn Pro Lys Val Arg Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp	
220 225 230	
tta gat aaa ggc gtt tct ggt tta cgc ttt gat acc gtt gcc acc tac	773
Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr	
235 240 245 250	
tcg aaa atc ccg aac ttc cct gac ctt agc caa cag cag tta aaa aat	821
Ser Lys Ile Pro Asn Phe Pro Asp Leu Ser Gln Gln Leu Lys Asn	
255 260 265	
ttc gcc gag gaa tat act aaa ggt cct aaa att cac gac tac gtg aat	869
Phe Ala Glu Glu Tyr Thr Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr Val Asn	
270 275 280	
gaa atg aac aga gaa gta tta tcc cac tat gat atc gcc act gcg ggg	917
Glu Met Asn Arg Glu Val Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr Ala Gly	
285 290 295	
gaa ata ttt ggg gtt cct ctg gat aaa tcg att aag ttt ttc gat cgc	965
Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe Asp Arg	
300 305 310	
cgt aga aat gaa tta aat ata gcg ttt acg ttt gat ctg atc agg ctc	1013
Arg Arg Asn Glu Leu Asn Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu	
315 320 325 330	
gat cgt gat gct gat gaa aga tgg cgg cga aaa gac tgg acc ctt tcg	1061
Asp Arg Asp Ala Asp Glu Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr Leu Ser	
335 340 345	
cag ttc cga aaa att gtc gat aag gtt gac caa acg gca gga gag tat	1109
Gln Phe Arg Lys Ile Val Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly Glu Tyr	
350 355 360	
ggg tgg aat gcc ttt ttc tta gac aat cac gac aat ccc cgc gcg gtt	1157
Gly Trp Asn Ala Phe Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val	
365 370 375	
tct cac ttt ggt gat gat cga cca caa tgg cgc gag cat gcg gcg aaa	1205
Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala Ala Lys	
380 385 390	
gca ctg gca aca ttg acg ctg acc cag cgt gca acg ccg ttt atc tat	1253
Ala Leu Ala Thr Leu Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr	
395 400 405 410	

cag ggt tca gaa ctc ggt atg acc aat tat ccc ttt aaa aaa atc gat	415	420	425	1301	
Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp					
gat ttc gat gat gta gag gtg aaa ggt ttt tgg caa gac tac gtt gaa	430	435	440	1349	
Asp Phe Asp Asp Val Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu					
aca ggc aaa gtg aaa gct gag gaa ttc ctt caa aac gta cgc caa acc	445	450	455	1397	
Thr Gly Lys Val Lys Ala Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr					
agc cgt gat aac agc aga acc ccc ttc cag tgg gat gca agc aaa aac	460	465	470	1445	
Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn					
gcg ggc ttt acc agt gga acc ccc tgg tta aaa atc aat ccc aat tat	475	480	485	1493	
Ala Gly Phe Thr Ser Gly Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr					
aaa gaa atc aac agc gca gat cag att aat aat cca aat tcc gta ttt	495	500	505	1541	
Lys Glu Ile Asn Ser Ala Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe					
aac tat tat aga aag ctg att aac att cgc cat gac atc cct gcc ttg	510	515	520	1589	
Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu					
acc tac ggc agt tat att gat tta gac cct gac aac aat tca gtc tat	525	530	535	1637	
Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr					
gct tac acc cga acg ctc ggc gct gaa aaa tat ctt gtc gtc att aat	540	545	550	1685	
Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn					
ttt aaa gaa gaa gtg atg cac tac acc ctg ccc ggg gat tta tcc atc	555	560	565	1733	
Phe Lys Glu Glu Val Met His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile					
aat aag gtg att act gaa aac aac agt cac act att gtc aat aaa aat	575	580	585	1781	
Asn Lys Val Ile Thr Glu Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn					
gac agg caa ctc cgt ctt gaa ccc tgg cag tcg ggc att tat aaa ctt	590	595	600	1829	
Asp Arg Gln Leu Arg Leu Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu					
aat ccg taggtcgac				1844	
Asn Pro					
<210> 14					
<211> 604					
<212> PRT					
<213> Künstliche Sequenz					
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for					
fusion-protein of signal peptide from proteinase					
inhibitor I and Sucrose isomerase from Erwinia					
rhapontici					
<400> 14					
Met Asp Val His Lys Glu Val Asn Phe Val Ala Tyr Leu Leu Ile Val	1	5	10	15	
Leu Gly Leu Leu Val Leu Val Ser Ala Met Glu His Val Asp Ala Lys	20	25	30		

Ala Cys Thr Glu Leu Gly Ile Leu Thr Val Gln Gln Ser Asn Ala Leu
35 40 45

Pro Thr Trp Trp Lys Gln Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser
50 55 60

Phe Lys Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Leu Asn Gly Ile Ile
65 70 75 80

Glu Asn Leu Asp Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile
85 90 95

Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Arg
100 105 110

Asp Tyr Arg Lys Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp
115 120 125

Arg Leu Ile Ser Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp
130 135 140

Ile Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Ala Trp Phe Val Gln Ser
145 150 155 160

Lys Ser Gly Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp
165 170 175

Gly Lys Asp Gly His Ala Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly
180 185 190

Ser Ala Trp Glu Lys Asp Asp Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr
195 200 205

Phe Ala Lys Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg
210 215 220

Gln Asp Leu Tyr Asp Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser
225 230 235 240

Gly Leu Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Asn Phe
245 250 255

Pro Asp Leu Ser Gln Gln Leu Lys Asn Phe Ala Glu Glu Tyr Thr
260 265 270

Lys Gly Pro Lys Ile His Asp Tyr Val Asn Glu Met Asn Arg Glu Val
275 280 285

Leu Ser His Tyr Asp Ile Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro
290 295 300

Leu Asp Lys Ser Ile Lys Phe Phe Asp Arg Arg Arg Asn Glu Leu Asn
305 310 315 320

Ile Ala Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ala Asp Glu
325 330 335

Arg Trp Arg Arg Lys Asp Trp Thr Leu Ser Gln Phe Arg Lys Ile Val
340 345 350

Asp Lys Val Asp Gln Thr Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Ala Phe Phe
355 360 365

Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp
370 375 380

Arg Pro Gln Trp Arg Glu His Ala Ala Lys Ala Leu Ala Thr Leu Thr
385 390 395 400

Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly
405 410 415

Met Thr Asn Tyr Pro Phe Lys Lys Ile Asp Asp Phe Asp Asp Val Glu
 420 425 430
 Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala
 435 440 445
 Glu Glu Phe Leu Gln Asn Val Arg Gln Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg
 450 455 460
 Thr Pro Phe Gln Trp Asp Ala Ser Lys Asn Ala Gly Phe Thr Ser Gly
 465 470 475 480
 Thr Pro Trp Leu Lys Ile Asn Pro Asn Tyr Lys Glu Ile Asn Ser Ala
 485 490 495
 Asp Gln Ile Asn Asn Pro Asn Ser Val Phe Asn Tyr Tyr Arg Lys Leu
 500 505 510
 Ile Asn Ile Arg His Asp Ile Pro Ala Leu Thr Tyr Gly Ser Tyr Ile
 515 520 525
 Asp Leu Asp Pro Asp Asn Asn Ser Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu
 530 535 540
 Gly Ala Glu Lys Tyr Leu Val Val Ile Asn Phe Lys Glu Glu Val Met
 545 550 555 560
 His Tyr Thr Leu Pro Gly Asp Leu Ser Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu
 565 570 575
 Asn Asn Ser His Thr Ile Val Asn Lys Asn Asp Arg Gln Leu Arg Leu
 580 585 590
 Glu Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Leu Asn Pro
 595 600

<210> 15
 <211> 2477
 <212> DNA
 <213> Klebsiella sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (214)..(2007)
 <223> coding for sucrose isomerase

<400> 15
 gatatcactg gtattatgga gtattatact cccccccttat ttactcatca aagccaggcg 60
 ttccactctg cctccggatataactttcc gggaaacaat cccttcctga aaataattat 120
 ttttaccgga gtcatactct ggctattgtat gatttacgct tttcttaat aacaattcgt 180
 ctcattcaca actgactttg caaggaaatt att atg tct ttt gtt acg cta cgt 234
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg
 1 5

acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct ttg ata ata agt ctg gcc tgc 282
 Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys
 10 15 20

ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg aat cag gat att cac gtt cca 330
 Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu Asn Gln Asp Ile His Val Gln
 25 30 35

aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg aaa gaa gct gtt ttt tat cag 378
 Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln
 40 45 50 55

atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat ggc att ggc gat	426
Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp	
60 65 70	
att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa tcg ctc ggt att	474
Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile	
75 80 85	
gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg aac acc gat aac	522
Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn	
90 95 100	
ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa gag tat ggc aca	570
Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr	
105 110 115	
atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa aaa cga aat atg	618
Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys Lys Arg Asn Met	
120 125 130 135	
cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt gat caa cac ccg	666
Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser Asp Gln His Pro	
140 145 150	
tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa aac aac cct tat cgt gac tat	714
Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr	
155 160 165	
tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat cag cca cct aat aat tac ccc	762
Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro	
170 175 180	
tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa aaa gat gca aag tca gga cag	810
Ser Phe Phe Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln	
185 190 195	
tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag caa cct gat ctc aac tgg gat	858
Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp	
200 205 210 215	
aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac gca atg ctc ccg ttc tgg ctg	906
Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu	
220 225 230	
gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt gat acg gtg gca act tat tcc	954
Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser	
235 240 245	
aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca cct gaa caa cag aaa aat ttt	1002
Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe	
250 255 260	
gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat att cat cga tac att cag gaa	1050
Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu	
265 270 275	
atg aac ccg aaa gtt ctg tcc ccg tat gat gtg gcc acc gcg ggt gaa	1098
Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu	
280 285 290 295	
att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg tcg cag ttt ttt gat cgc cgc	1146
Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg	
300 305 310	
cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg ttt gac ctc att cgt ctc gat	1194
Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp	
315 320 325	

cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac aag tcg tgg tcg ctc tct cag	330	335	340	1242
Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln				
ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat gtc acg gtc gga aag tat ggc	345	350	355	1290
Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly				
tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat gac aac ccc cgt gcg gta tct	360	365	370	1338
Trp Asn Thr Phe Leu Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser				
cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg cgg gag gcg tcg gct aag gca	380	385	390	1386
His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala				
ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg gcg acg ccg ttt att tat cag	395	400	405	1434
Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln				
ggt tca gag ctg gga atg act aat tat ccc ttc agg caa ctc aac gaa	410	415	420	1482
Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu				
ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc tgg cag gat tat gtc cag agt	425	430	435	1530
Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser				
gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc gat aat gtg cgc ctg acg agc	440	445	450	1578
Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser				
cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag tgg aat gac acc ctg aat gct	460	465	470	1626
Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala				
ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt cac atc aac cca aac tat gtg	475	480	485	1674
Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe His Ile Asn Pro Asn Tyr Val				
gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc cgc gaa gat tca gtg ctg aat	490	495	500	1722
Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn				
tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc cac cat atc cct gct ctg gta	505	510	515	1770
Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg His His Ile Pro Ala Leu Val				
tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca cag gac aat acc gtt tat gcc	520	525	530	1818
Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala				
tat acc cga acg ctg ggt aac gag cgt tat ctg gtc gtg gtg aac ttt	540	545	550	1866
Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg Tyr Leu Val Val Val Asn Phe				
aag gag tac ccg gtc cgc tat act ctc ccg gct aat gat gcc atc gag	555	560	565	1914
Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu				
gaa gtg gtc att gat act cag cag gcg gct gcg ccg cac agc aca	570	575	580	1962
Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Ala Ala Pro His Ser Thr				
tcc ctg tca ttg agc ccc tgg cag gca ggt gtg tat aag ctg cgg	585	590	595	2007
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala Gly Val Tyr Lys Leu Arg				

taatcacctg ggggattgat gacaagttcc ccagacaata gagtttcca ggtctttagc 2067
actgctgtgc tcagcgatag ttgtgctctc ctgtgacttc gtaagtgcct gtctcatggc 2127
aggcattgtc aggtcagaag ctttcagg cagcctcgag taacagcgcc cagttagcat 2187
ccccctgaaa gatgggggt atgtataaaat tagcgtaaa gaacatgaac cagccaccgt 2247
catcttatca accaacaggc gagatgagct ccgattcctg attcttcaca ttgccgttga 2307
tgccctgaa gcctcgccct ttagggccgg gaaataagca cagcatctgg cgatctctt 2367
tgccacttta ctgatcacat ccggcctcat ccatttccgg gcggcttcag ccatcaggag 2427
aaagggtagt ggtcggtat atgagccagg ccaaaaaaag gtgtgatatc 2477

<210> 16

<211> 598

<212> PRT

<213> Klebsiella sp.

<400> 16

Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
1 5 10 15

Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
20 25 30

Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
35 40 45

Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
50 55 60

Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
85 90 95

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln
100 105 110

Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala
115 120 125

Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
130 135 140

His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys
145 150 155 160

Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn
165 170 175

Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
180 185 190

Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln
195 200 205

Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
210 215 220

Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe
225 230 235 240

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
245 250 255

Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn
260 265 270

Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr
275 280 285

Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser
290 295 300

Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met
305 310 315 320

Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His
325 330 335

Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp
340 345 350

Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His
355 360 365

Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
370 375 380

Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg
385 390 395 400

Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
405 410 415

Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
420 425 430

Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
435 440 445

Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
450 455 460

Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
465 470 475 480

His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr
485 490 495

Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
500 505 510

His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
515 520 525

Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
530 535 540

Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
545 550 555 560

Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
565 570 575

Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
580 585 590

Gly Val Tyr Lys Leu Arg
595

<210> 17

<211> 1797

<212> DNA

<213> Klebsiella sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1794)
 <223> coding for sucrose isomerase
 <400> 17
 atg tct ttt gtt acg cta cgt acc ggg gtg gct gtc gcg ctg tca tct 48
 Met Ser Phe Val Thr Leu Arg Thr Gly Val Ala Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 ttg ata ata agt ctg gcc tgc ccg gct gtc agt gct gca cca tcc ttg 96
 Leu Ile Ile Ser Leu Ala Cys Pro Ala Val Ser Ala Ala Pro Ser Leu
 20 25 30
 aat cag gat att cac gtt caa aag gaa agt gaa tat cct gca tgg tgg 144
 Asn Gln Asp Ile His Val Gln Lys Glu Ser Glu Tyr Pro Ala Trp Trp
 35 40 45
 aaa gaa gct gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc 192
 Lys Glu Ala Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr
 50 55 60
 aat gat gat ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac 240
 Asn Asp Asp Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp
 65 70 75 80
 tat ctg aaa tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac 288
 Tyr Leu Lys Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr
 85 90 95
 gac tct ccg aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag 336
 Asp Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln
 100 105 110
 ata atg aaa gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc 384
 Ile Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala
 115 120 125
 gaa atg aaa aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac 432
 Glu Met Lys Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn
 130 135 140
 cat acc agt gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa 480
 His Thr Ser Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys
 145 150 155 160
 aac aac cct tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat 528
 Asn Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn
 165 170 175
 cag cca cct aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa 576
 Gln Pro Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln
 180 185 190
 aaa gat gca aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag 624
 Lys Asp Ala Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln
 195 200 205
 caa cct gat ctc aac tgg gat aac ccg aaa gta cgt gag gat ctt tac 672
 Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Asn Pro Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr
 210 215 220
 gca atg ctc cgc ttc tgg ctg gat aaa ggc gtt tca ggc atg cga ttt 720
 Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met Arg Phe
 225 230 235 240
 gat acg gtg gca act tat tcc aaa atc ccg gga ttt ccc aat ctg aca 768
 Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
 245 250 255

cct gaa caa cag aaa aat ttt gct gaa caa tac acc atg ggg cct aat	816
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn	
260 265 270	
att cat cga tac att cag gaa atg aac cgg aaa gtt ctg tcc cgg tat	864
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr	
275 280 285	
gat gtg gcc acc gcg ggt gaa att ttt ggc gtc ccg ctg gat cgt tcg	912
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser	
290 295 300	
tcg cag ttt ttt gat cgc cgc cga cat gag ctg aat atg gcg ttt atg	960
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met	
305 310 315 320	
ttt gac ctc att cgt ctc gat cgc gac agc aat gaa cgc tgg cgt cac	1008
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His	
325 330 335	
aag tcg tgg tcg ctc tct cag ttc cgc cag atc atc agc aaa atg gat	1056
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp	
340 345 350	
gtc acg gtc gga aag tat ggc tgg aac acg ttc ttc tta gat aac cat	1104
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His	
355 360 365	
gac aac ccc cgt gcg gta tct cac ttc ggg gat gac agg ccg caa tgg	1152
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp	
370 375 380	
cgg gag gcg tcg gct aag gca ctg gcg acg att acc ctc act cag cgg	1200
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg	
385 390 395 400	
gcg acg ccg ttt att tat cag ggt tca gag ctg gga atg act aat tat	1248
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr	
405 410 415	
ccc ttc agg caa ctc aac gaa ttt gac gac atc gag gtc aaa ggt ttc	1296
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe	
420 425 430	
tgg cag gat tat gtc cag agt gga aaa gtc acg gcc aca gag ttt ctc	1344
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu	
435 440 445	
gat aat gtg cgc ctg acg agc cgc gat aac agc aga aca cct ttc cag	1392
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln	
450 455 460	
tgg aat gac acc ctg aat gct ggt ttt act cgc gga aag ccg tgg ttt	1440
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe	
465 470 475 480	
cac atc aac cca aac tat gtg gag atc aac gcc gaa cgc gaa gaa acc	1488
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr	
485 490 495	
cgc gaa gat tca gtg ctg aat tac tat aaa aaa atg att cag cta cgc	1536
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg	
500 505 510	
cac cat atc cct gct ctg gta tat ggc gcc tat cag gat ctt aat cca	1584
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro	
515 520 525	

cag	gac	aat	acc	gtt	tat	gcc	tat	acc	cga	acg	ctg	ggt	aac	gag	cgt	1632
Gln	Asp	Asn	Thr	Val	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Glu	Arg	
530				535						540						
tat	ctg	gtc	gtg	gtg	aac	ttt	aag	gag	tac	ccg	gtc	cgc	tat	act	ctc	1680
Tyr	Leu	Val	Val	Val	Asn	Phe	Lys	Glu	Tyr	Pro	Val	Arg	Tyr	Thr	Leu	
545				550					555				560			
ccg	gct	aat	gat	gcc	atc	gag	gaa	gtg	gtc	att	gat	act	cag	cag	cag	1728
Pro	Ala	Asn	Asp	Ala	Ile	Glu	Glu	Val	Val	Ile	Asp	Thr	Gln	Gln	Gln	
					565				570			575				
gcg	gct	gct	ccg	cac	agc	aca	tcc	ctg	tca	ttg	agc	ccc	tgg	cag	gca	1776
Ala	Ala	Ala	Pro	His	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Trp	Gln	Ala	
					580			585			590					
ggt	gtg	tat	aag	ctg	cgg	taa										1797
Gly	Val	Tyr	Lys	Leu	Arg											
			595													
<210>	18															
<211>	598															
<212>	PRT															
<213>	Klebsiella sp.															
<400>	18															
Met	Ser	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Thr	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ser	
1				5					10				15			
Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	Pro	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Leu	
				20					25				30			
Asn	Gln	Asp	Ile	His	Val	Gln	Lys	Glu	Ser	Glu	Tyr	Pro	Ala	Trp	Trp	
				35				40			45					
Lys	Glu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Pro	Arg	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	
				50				55			60					
Asn	Asp	Asp	Gly	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gly	Ile	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	
				65			70			75			80			
Tyr	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ile	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Asn	Pro	His	Tyr	
				85				90			95					
Asp	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Arg	Gln	
				100				105			110					
Ile	Met	Lys	Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	
				115				120			125					
Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	
				130			135			140						
His	Thr	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	
				145			150			155			160			
Asn	Asn	Pro	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	
				165				170			175					
Gln	Pro	Pro	Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	
					180			185			190					
Lys	Asp	Ala	Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln	
				195				200			205					
Gln	Pro	Asp	Leu	Asn	Trp	Asp	Asn	Pro	Lys	Val	Arg	Glu	Asp	Leu	Tyr	
				210			215			220						
Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Val	Ser	Gly	Met	Arg	Phe	
				225				230			235			240		

Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Ile Pro Gly Phe Pro Asn Leu Thr
245 250 255
Pro Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ala Glu Gln Tyr Thr Met Gly Pro Asn
260 265 270
Ile His Arg Tyr Ile Gln Glu Met Asn Arg Lys Val Leu Ser Arg Tyr
275 280 285
Asp Val Ala Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Val Pro Leu Asp Arg Ser
290 295 300
Ser Gln Phe Phe Asp Arg Arg Arg His Glu Leu Asn Met Ala Phe Met
305 310 315 320
Phe Asp Leu Ile Arg Leu Asp Arg Asp Ser Asn Glu Arg Trp Arg His
325 330 335
Lys Ser Trp Ser Leu Ser Gln Phe Arg Gln Ile Ile Ser Lys Met Asp
340 345 350
Val Thr Val Gly Lys Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Asp Asn His
355 360 365
Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln Trp
370 375 380
Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Ile Thr Leu Thr Gln Arg
385 390 395 400
Ala Thr Pro Phe Ile Tyr Gln Gly Ser Glu Leu Gly Met Thr Asn Tyr
405 410 415
Pro Phe Arg Gln Leu Asn Glu Phe Asp Asp Ile Glu Val Lys Gly Phe
420 425 430
Trp Gln Asp Tyr Val Gln Ser Gly Lys Val Thr Ala Thr Glu Phe Leu
435 440 445
Asp Asn Val Arg Leu Thr Ser Arg Asp Asn Ser Arg Thr Pro Phe Gln
450 455 460
Trp Asn Asp Thr Leu Asn Ala Gly Phe Thr Arg Gly Lys Pro Trp Phe
465 470 475 480
His Ile Asn Pro Asn Tyr Val Glu Ile Asn Ala Glu Arg Glu Glu Thr
485 490 495
Arg Glu Asp Ser Val Leu Asn Tyr Tyr Lys Lys Met Ile Gln Leu Arg
500 505 510
His His Ile Pro Ala Leu Val Tyr Gly Ala Tyr Gln Asp Leu Asn Pro
515 520 525
Gln Asp Asn Thr Val Tyr Ala Tyr Thr Arg Thr Leu Gly Asn Glu Arg
530 535 540
Tyr Leu Val Val Val Asn Phe Lys Glu Tyr Pro Val Arg Tyr Thr Leu
545 550 555 560
Pro Ala Asn Asp Ala Ile Glu Glu Val Val Ile Asp Thr Gln Gln Gln
565 570 575
Ala Ala Ala Pro His Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ser Pro Trp Gln Ala
580 585 590
Gly Val Tyr Lys Leu Arg
595

<210> 19
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Enterobacter sp.
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(471)
 <223> coding for fragment of sucrose isomerase
 <400> 19

gtt ttt tat cag atc tat cct cgc tca ttt aaa gac acc aat gat gat	48
Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp	
1 5 10 15	
ggc att ggc gat att cgc ggt att att gaa aag ctg gac tat ctg aaa	96
Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys	
20 25 30	
tcg ctc ggt att gac gct atc tgg atc aat ccc cat tac gac tct ccg	144
Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro	
35 40 45	
aac acc gat aac ggc tat gac atc agt aat tat cgt cag ata atg aaa	192
Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys	
50 55 60	
gag tat ggc aca atg gag gat ttt gat agc ctt gtt gcc gaa atg aaa	240
Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Ser Leu Val Ala Glu Met Lys	
65 70 75 80	
aaa cga aat atg cgc tta atg atc gac gtg gtc att aac cat acc agt	288
Lys Arg Asn Met Arg Leu Met Ile Asp Val Val Ile Asn His Thr Ser	
85 90 95	
gat caa cac ccg tgg ttt att cag agt aaa agc gat aaa aac aac cct	336
Asp Gln His Pro Trp Phe Ile Gln Ser Lys Ser Asp Lys Asn Asn Pro	
100 105 110	
tat cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac gga aaa gat aat cag cca cct	384
Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys Asp Asn Gln Pro Pro	
115 120 125	
aat aat tac ccc tca ttt ttc ggc ggc tcg gca tgg caa aaa gat gca	432
Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala Trp Gln Lys Asp Ala	
130 135 140	
aag tca gga cag tac tat tta cac tat ttt gcc aga cag	471
Lys Ser Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Ala Arg Gln	
145 150 155	

<210> 20
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Enterobacter sp.
 <400> 20

Val Phe Tyr Gln Ile Tyr Pro Arg Ser Phe Lys Asp Thr Asn Asp Asp	
1 5 10 15	
Gly Ile Gly Asp Ile Arg Gly Ile Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys	
20 25 30	
Ser Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro His Tyr Asp Ser Pro	
35 40 45	
Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asn Tyr Arg Gln Ile Met Lys	
50 55 60	

Glu	Tyr	Gly	Thr	Met	Glu	Asp	Phe	Asp	Ser	Leu	Val	Ala	Glu	Met	Lys
65					70					75					80
Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Leu	Met	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Thr	Ser
						85				90					95
Asp	Gln	His	Pro	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ser	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro
			100					105					110		
Tyr	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Arg	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	Gln	Pro	Pro
			115				120					125			
Asn	Asn	Tyr	Pro	Ser	Phe	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Gln	Lys	Asp	Ala
			130			135					140				
Lys	Ser	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Arg	Gln			
145				150						155					

<210> 21

<211> 1782

<212> DNA

<213> *Pseudomonas mesoacidophila* MX45

1 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1779)

<223> coding for sucrose isomerase

<400> 21

```

atg ctt atg aag aga tta ttc gcc gcg tct ctg atg ctt gct ttt tca 48
Met Leu Met Lys Arg Leu Phe Ala Ala Ser Leu Met Leu Ala Phe Ser
1           5           10          15

```

```

agc gtc tcc tct gtg agg gct gag gag gcc gta aag ccg ggc gcg cca 96
Ser Val Ser Ser Val Arg Ala Glu Glu Ala Val Lys Pro Gly Ala Pro
20          25          30

```

tgg tgg aaa agt gct gtc ttc tat cag gtc tat ccg cgc tcg ttc aag 144
 Trp Trp Lys Ser Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro Arg Ser Phe Lys
 35 40 45

gat acc aac ggt gat ggg atc ggc gat ttc aaa gga ctg acg gag aag	192
Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Phe Lys Gly Leu Thr Glu Lys	
50 55 60	

ctc gac tat ctc aag ggg ctc ggc ata gac gcc atc tgg atc aat cca 240
 Leu Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Ile Asp Ala Ile Trp Ile Asn Pro
 65 70 75 80

cat tac gcg tct ccc aac acc gat aat ggc tac gat atc agc gac tat 288
His Tyr Ala Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp Ile Ser Asp Tyr
85 90 95

```

cga gag gtc atg aag gaa tat ggg acg atg gag gac ttc gat cgt ctg 336
Arg Glu Val Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp Phe Asp Arg Leu
          100          105          110

```

atg gct gag ttg aag aag cgc ggc atg cggt ctc atg gtt gat gtc gtg 384
 Met Ala Glu Leu Lys Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Val Asp Val Val
 115 120 125

atc aac cat tcg agt gac caa cac gaa tgg ttc aag agc agc cg^g gcc 432
 Ile Asn His Ser Ser Asp Gln His Glu Trp Phe Lys Ser Ser Arg Ala
 130 135 140

tcc aaa gac aat ccc tac cgt gac tat tat ttc tgg cgt gac ggc aaa 480
 Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys
 145 150 155 160

gac ggt cac gag cca aac aat tac cct tcc ttc ggc ggt tcg gca	528
Asp Gly His Glu Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala	
165 170 175	
tgg gag aag gac ccc gta acc ggg caa tat tac ctg cat tat ttc ggt	576
Trp Glu Lys Asp Pro Val Thr Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Gly	
180 185 190	
cgt cag cag cca gat ctg aac tgg gac acg ccg aag ctt cgc gag gaa	624
Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Thr Pro Lys Leu Arg Glu Glu	
195 200 205	
ctc tat gcg atg ctg cgg ttc tgg ctc gac aag ggc gta tca ggc atg	672
Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met	
210 215 220	
cggttccatgatgtgtgtacc tac tcg aag aca ccg ggt ttc ccg gat	720
Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Thr Pro Gly Phe Pro Asp	
225 230 235 240	
ctg aca ccg gag cag atg aag aac ttc gcg gag gcc tat acc cag ggg	768
Leu Thr Pro Glu Gln Met Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Gln Gly	
245 250 255	
ccg aac ctt cat cgt tac ctg cag gaa atg cac gag aag gtc ttc gat	816
Pro Asn Leu His Arg Tyr Leu Gln Glu Met His Glu Lys Val Phe Asp	
260 265 270	
cat tat gac gcg gtc acg gcc ggc gaa atc ttc ggc gct ccg ctc aat	864
His Tyr Asp Ala Val Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Ala Pro Leu Asn	
275 280 285	
caa gtg ccg ctg ttc atc gac agc cgg agg aaa gag ctg gat atg gct	912
Gln Val Pro Leu Phe Ile Asp Ser Arg Arg Lys Glu Leu Asp Met Ala	
290 295 300	
tcc acc ttc gat ctg atc cgt tat gat cgc gca ctg gat cgt tgg cat	960
Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Tyr Asp Arg Ala Leu Asp Arg Trp His	
305 310 315 320	
acc att ccg cgt acc tta gcg gac ttc cgt caa acg atc gat aag gtc	1008
Thr Ile Pro Arg Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Thr Ile Asp Lys Val	
325 330 335	
gac gcc atc gcg ggc gaa tat ggc tgg aac acg ttc ttc ctc ggc aat	1056
Asp Ala Ile Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Gly Asn	
340 345 350	
cac gac aat ccc cgt gcg gta tcg cat ttt ggt gac gat cgg ccg caa	1104
His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln	
355 360 365	
tgg cgc gaa gcc tcg gcc aag gct ctg gcc acc gtc acc ttg acc cag	1152
Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu Thr Gln	
370 375 380	
cga gga acg ccg ttc atc ttc caa gga gat gaa ctc gga atg acc aac	1200
Arg Gly Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn	
385 390 395 400	
tac ccc ttc aag acg ctg cag gac ttt gat gat atc nnn nnn nnn nnn	1248
Tyr Pro Phe Lys Thr Leu Gln Asp Phe Asp Asp Ile Xaa Xaa Xaa Xaa	
405 410 415	
nnn	1296
Xaa	
420 425 430	

nnn nnt	gtg gcg ttg act	1344		
Xaa Val	Ala Leu Thr			
435	440	445		
agc cga gca aac gcc cgc acg ccc ttt caa tgg gat	gac agt gct aat	1392		
Ser Arg Ala Asn Ala Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp	Asp Ser Ala Asn			
450	455	460		
gcg gga ttc aca act ggc aag cct tgg cta aag gtc	aat cca aac tac	1440		
Ala Gly Phe Thr Thr Gly Lys Pro Trp Leu Lys Val	Asn Pro Asn Tyr			
465	470	475	480	
act gag atc aac gcc gcg gaa att ggc gat cct aaa	tcg gtc tac	1488		
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Arg Glu Ile Gly Asp Pro	Lys Ser Val Tyr			
485	490	495		
agc ttt tac cgc aac ctg atc tca atc cgg cat gaa	act ccc gct ctt	1536		
Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu	Thr Pro Ala Leu			
500	505	510		
tcg acc ggg agc tat cgc gac atc gat ccg agt aat	gcc gat gtc tat	1584		
Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn	Ala Asp Val Tyr			
515	520	525		
gcc tat acg cgc agc cag gat ggc gag acc tat ctg	gtc gta gtc aac	1632		
Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu	Val Val Val Asn			
530	535	540		
ttc aag gca gag cca agg agt ttc acg ctt ccg gac	ggc atg cat att	1680		
Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp	Gly Met His Ile			
545	550	555	560	
gcc gaa acc ctg att gag agc agt tcg cca gca gct	ccg gcg gcg ggg	1728		
Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Pro Ala Ala Pro	Ala Gly			
565	570	575		
gct gca agc ctt gag ctg cag cct tgg cag tcc ggc	atc tac aag gtg	1776		
Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly	Ile Tyr Lys Val			
580	585	590		
aag taa		1782		
Lys				
<210> 22				
<211> 593				
<212> PRT				
<213> Pseudomonas mesoacidophila MX45				
<400> 22				
Met Leu Met Lys Arg Leu Phe Ala Ala Ser Leu Met	Leu Ala Phe Ser			
1	5	10	15	
Ser Val Ser Ser Val Arg Ala Glu Glu Ala Val Lys	Pro Gly Ala Pro			
20	25		30	
Trp Trp Lys Ser Ala Val Phe Tyr Gln Val Tyr Pro	Arg Ser Phe Lys			
35	40		45	
Asp Thr Asn Gly Asp Gly Ile Gly Asp Phe Lys	Gly Leu Thr Glu Lys			
50	55		60	
Leu Asp Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Ile Asp Ala Ile	Trp Ile Asn Pro			
65	70		75	80
His Tyr Ala Ser Pro Asn Thr Asp Asn Gly Tyr Asp	Ile Ser Asp Tyr			
85	90		95	
Arg Glu Val Met Lys Glu Tyr Gly Thr Met Glu Asp	Phe Asp Arg Leu			
100	105		110	

Met Ala Glu Leu Lys Lys Arg Gly Met Arg Leu Met Val Asp Val Val
115 120 125
Ile Asn His Ser Ser Asp Gln His Glu Trp Phe Lys Ser Ser Arg Ala
130 135 140
Ser Lys Asp Asn Pro Tyr Arg Asp Tyr Tyr Phe Trp Arg Asp Gly Lys
145 150 155 160
Asp Gly His Glu Pro Asn Asn Tyr Pro Ser Phe Phe Gly Gly Ser Ala
165 170 175
Trp Glu Lys Asp Pro Val Thr Gly Gln Tyr Tyr Leu His Tyr Phe Gly
180 185 190
Arg Gln Gln Pro Asp Leu Asn Trp Asp Thr Pro Lys Leu Arg Glu Glu
195 200 205
Leu Tyr Ala Met Leu Arg Phe Trp Leu Asp Lys Gly Val Ser Gly Met
210 215 220
Arg Phe Asp Thr Val Ala Thr Tyr Ser Lys Thr Pro Gly Phe Pro Asp
225 230 235 240
Leu Thr Pro Glu Gln Met Lys Asn Phe Ala Glu Ala Tyr Thr Gln Gly
245 250 255
Pro Asn Leu His Arg Tyr Leu Gln Glu Met His Glu Lys Val Phe Asp
260 265 270
His Tyr Asp Ala Val Thr Ala Gly Glu Ile Phe Gly Ala Pro Leu Asn
275 280 285
Gln Val Pro Leu Phe Ile Asp Ser Arg Arg Lys Glu Leu Asp Met Ala
290 295 300
Phe Thr Phe Asp Leu Ile Arg Tyr Asp Arg Ala Leu Asp Arg Trp His
305 310 315 320
Thr Ile Pro Arg Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Thr Ile Asp Lys Val
325 330 335
Asp Ala Ile Ala Gly Glu Tyr Gly Trp Asn Thr Phe Phe Leu Gly Asn
340 345 350
His Asp Asn Pro Arg Ala Val Ser His Phe Gly Asp Asp Arg Pro Gln
355 360 365
Trp Arg Glu Ala Ser Ala Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Leu Thr Gln
370 375 380
Arg Gly Thr Pro Phe Ile Phe Gln Gly Asp Glu Leu Gly Met Thr Asn
385 390 395 400
Tyr Pro Phe Lys Thr Leu Gln Asp Phe Asp Asp Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
405 410 415
Xaa
420 425 430
Xaa Val Ala Leu Thr
435 440 445
Ser Arg Ala Asn Ala Arg Thr Pro Phe Gln Trp Asp Asp Ser Ala Asn
450 455 460
Ala Gly Phe Thr Thr Gly Lys Pro Trp Leu Lys Val Asn Pro Asn Tyr
465 470 475 480
Thr Glu Ile Asn Ala Ala Arg Glu Ile Gly Asp Pro Lys Ser Val Tyr
485 490 495

Ser Phe Tyr Arg Asn Leu Ile Ser Ile Arg His Glu Thr Pro Ala Leu
 500 505 510

Ser Thr Gly Ser Tyr Arg Asp Ile Asp Pro Ser Asn Ala Asp Val Tyr
 515 520 525

Ala Tyr Thr Arg Ser Gln Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Val Val Val Asn
 530 535 540

Phe Lys Ala Glu Pro Arg Ser Phe Thr Leu Pro Asp Gly Met His Ile
 545 550 555 560

Ala Glu Thr Leu Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ala Ala Pro Ala Ala Gly
 565 570 575

Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gln Pro Trp Gln Ser Gly Ile Tyr Lys Val
 580 585 590

Lys

<210> 23
 <211> 1417
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)...(1417)
 <223> promoter of lemmi9

<400> 23
 ataatttaac catctagaga tccacaaatc atgtttccat atcatggtag tagttggtag 60
 tacgaagtat ctataaatta ttgagaaata cctgggtggaa tcccaagtga aacggaaagg 120
 cccttactta ttaaataaaa aaacatttga caatagaaaa ttgagaccaa tctgcataatg 180
 aaacatcagg atccccacat ttcacaaaatt ttacaagtta attaagccct actctgtcca 240
 tatggactt ttctgcactt ccacgcacca acgaatatgc tgaaaaattga tgtttttagat 300
 gtgtacgaat aaagcaatca aagaacgcgg ggcgaacgcg cgctggagac actgccattc 360
 atgtgtgcct aacgtgtttt cttagtcat tacgctccta ctaccgactc aatatataatt 420
 aactatagta ttttttattt atgacgagaa acgtatttt aaatgttagat atattttaac 480
 aagctatgat aattacatct tggccgtt gtcataaatg acacaaaatta aggtttgatt 540
 ttctgtccact tctaagattt cttgttctaa tactagtata tttctgattt aaaaagttat 600
 ttagttttt ttgaatttagc tgataaatgc caaaaactga aaattaaagt actttttat 660
 ttataaaaaa taatatcatg gaaattaaaaa cgagaaaatta atgaaaaagt agaagattgc 720
 tttgccataa tatagtgtt ctttcgtat tattttatta agcgtaaat tacataaagg 780
 tatccgtgct taaatttcta gctttagagc attttttgaa gcaaaagttt cgataaatca 840
 agttttataa taaaattaca atcatcattt ctaattatata taattctta aaaataaaaat 900
 taaaaaaaata tataacaataa ttgaagctcg gataaattaa aatatgtaac tattaaatata 960
 tactcggata tattaaatata tattcgatta tattaaatatg tagctaaaa tatattaaat 1020
 aataatacaa atatattaaat atatgtaaat catatacatt aaaaactatc ttaaatataat 1080
 aatatgcagc tgtaatataat taacccagat acataagcac ctcgagtaca ttaaacaat 1140
 aaaaagaattt aaaaataataa aaaataagt aaagcaataa attgtatatt tctataattt 1200
 atccctttat taatactaaa taaagttaga gaacctaaac aggaagcaca attatgacac 1260
 gagagagagaa tagcgcgtca attgtgaccc ttacgcgga agtataatgta ataaatagta 1320
 gactctttt ctatatttgt atatccata acaagagcag agatattcgt ttagcacaat 1380
 acaggcatac tattcaattc ctttcgttc cagaagc 1417

<210> 24
 <211> 374
 <212> DNA
 <213> Nicotiana tabacum

<220>
<211> promoter
<222> (1)..(374)
<223> promoter of delta-0.3TobRB7

<400> 24
agcttatcta aacaaagttt taaattcatt tcctaaacgt ccattacaat gtaatataac 60
ttagtcgtct caattaaacc attaatgtga aatataaatac aaaaaaagcc aaagggcggt 120
gggacggcgc caatcatttg tcctagtcctt ctc当地ataag gcccatggtc ggcaaaaacca 180
aacacaaaaat gtgttatttt taattttttc ctcttttattt gttaaagttt caaaatgtgt 240
tatttttgggt aagaccctat ggatataaa agacaggtta tgtgaaactt ggaaaaccat 300
caagtttaaa gcaaaaaccct ctt当地aaact taaattgagc ttctttgggg gcattttct 360
agtgagaact aaaa 374

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 25
ggatccggta ccgttcagca atcaaat 27

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 26
gtcgacgtct tgccaaaaac ctt 23

<210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 27
gtcgacctac gtgatataagt ttata 25

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 28
atcgaattca taatttaacc atctagag 28

<210> 29
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 29

atcggtagct gcttctggaa cgaaaagg

28

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 30

ggaattcagc ttatctaaac aaagttttaa attc

34

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 31

gggttaccagt tctcactaga aaaatgcccc

30

<210> 32

<211> 461

<212> DNA

<213> Wheat dwarf virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(461)

<223> V-sense promoter from Wheat Dwarf Virus

<400> 32

ccggcagggtc cttagcgaaa aaacgggggtg tgccagaaaa ctctatgctc taccctgcgt 60
ggaggtgtga attctgcaca ctgctaattgc aatgtgtccca atgcattata tagggcaggt 120
tttggcggga gaacaggccc cttgtgttcc cacgggagcgt tagcgtatcg tgtggccct 180
gttcgggtgtg tggtcgggggc gcctccacgc gggttataat attaccccccgt gtgggtggccc 240
ccgacgcgcga ctcggctttt cgtgagtgctc cgaggcttt tggaccacat cttttctgac 300
cacttcgtg gaatatgttg atttatacaca cttttgacgc gggaaatctgt gccatgcctt 360
agcttataag gaagtgcgtg gtagcccatc tcgatggagc aggcaatagc cccccccgtt 420
cctatacggg actatcaata ccagaccctt tccattcccg g 461

<210> 33

<211> 1173

<212> DNA

<213> Maize streak virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1173)

<223> V-sense promotor from Maize Streak Virus

<400> 33

aagcttattt gcagagtatt caaaaactg caatttgtg gaccatcaa agggaaagctc 60
tttctggatc atggagaggt actcttcttt ggaagtagcgt tgtgaaataa tgtctcgcat 120
tatttcatct ttagaaggct tttttccctt tacctctgaa tcagatttc cgaggaagg 180

ggacttccta ggaatgaaag tacctctctc aaacacagcc agaggttct tgagaatgta 240
atccctcacc ctgtttactg acttggact ctgaatatt gggtaaacc catttatc 300
aaagaacctt gagtcagata tccttaccgg cttctctgtc tgaagcaatg catgtaatg 360
caaacttcca tctttatgtg cctctcgcc acatagaatg tatttggaa tccaacgaac 420
aacgagctcc cagatcatct gacaggcgat ttcaggatt tctggacact ttggataggt 480
taggaacgtg ttagcgttcc ggtgtgagaa ctgacggtt gatgaggagg aggccattgc 540
cgacgacgga ggttgggact gagggatggc agactgggag ctccaaactc tatagtatac 600
ccgtgcgcct tcgcctcgag gcaaattccg ccgctccctt gtctttagt gtttgc当地 660
gggcggacc gggccggccc agcaggaaaa gaaggcgcc actaatatta ccgcgccttc 720
tttcctgct agggcccggt agggtcgacc ccgagcgatt tgatgtaaag ttggccttg 780
ctttgtatga ttatctaaa gcagcccatt ctaaagaatc cggtcccggt cactataat 840
tgcctaaca gtgcgattca ttcatggatc cacagaacgc cctgtattat cagccgcggg 900
tacccacagc agctccgaca tccggaggag tgccgtggag tcgcgttaggc gaggtacta 960
ttttgagctt tggtcattt atttgccttt acctgctta ccttgggtg ctgagagacc 1020
ttatcttagt tctgaaggct cgacaaggca gatccacgga ggagctgata ttggggac 1080
aagctgtgga taggagcaac cctatcccta atataccagc accaccaagt cagggcaatc 1140
ccggccatt tggtccatcg actctagtcg acc 1173

<210> 34

<211> 353

<212> DNA

<213> Pepper huasteco virus

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(353)

<223> V-sense promoter from Pepper huasteco virus

<400> 34

catatttata ataagagagg tgtacaccga ttggagctct ttaacctggg cttattgtat 60
cggtgtattt gtagccaata tatagtatatt gggagttatc taggatcttc gtacacgtga 120
ggccatccg ttataatatt accggatggc cgaccgctta ctttatctat ccgtactgct 180
ttatgtaat taaagatgtt acttttatgc tatccaatga agcgtacgt ctgggaagct 240
tagttatcg ttccagacgt ggggaccaag tagtgtatga ccactttatt gactgtcagc 300
tttataaatt gaaataaaaa cataagtggt ccacgtacct ttaattcaaa atg 353

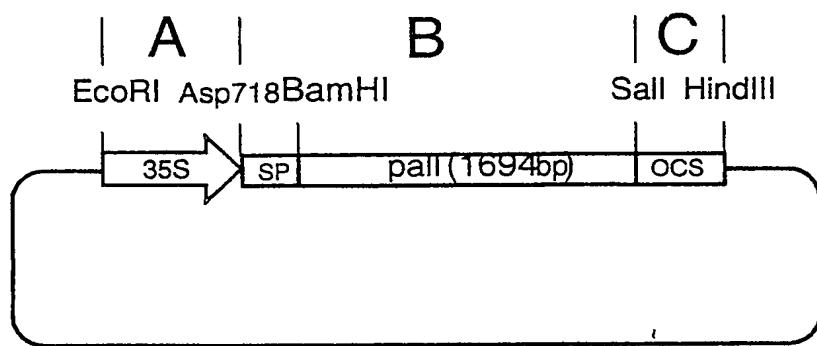


Fig.1

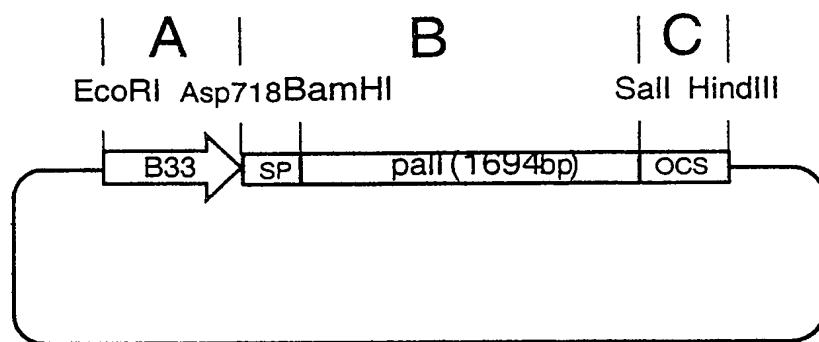


Fig.2

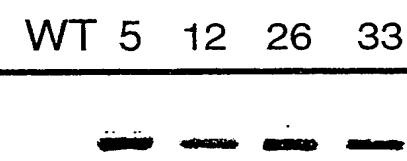


Fig.3

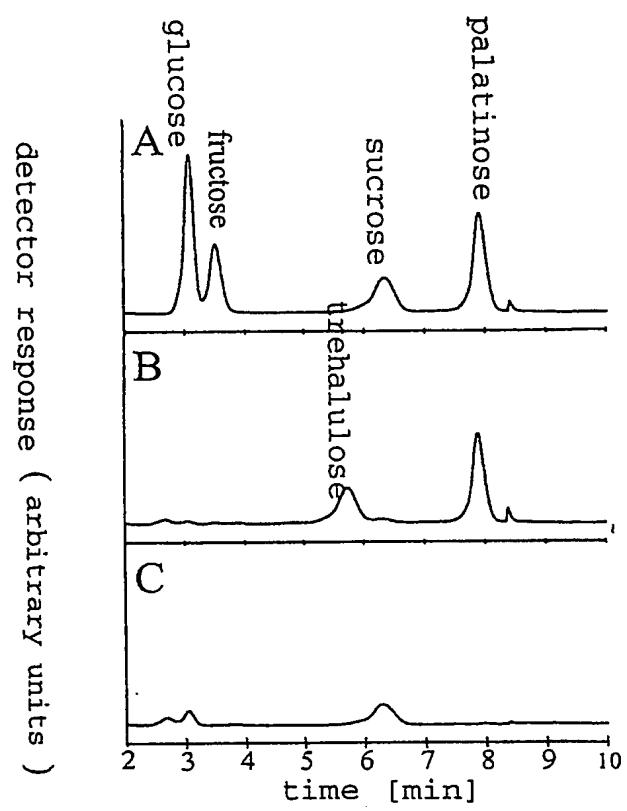


Fig. 4

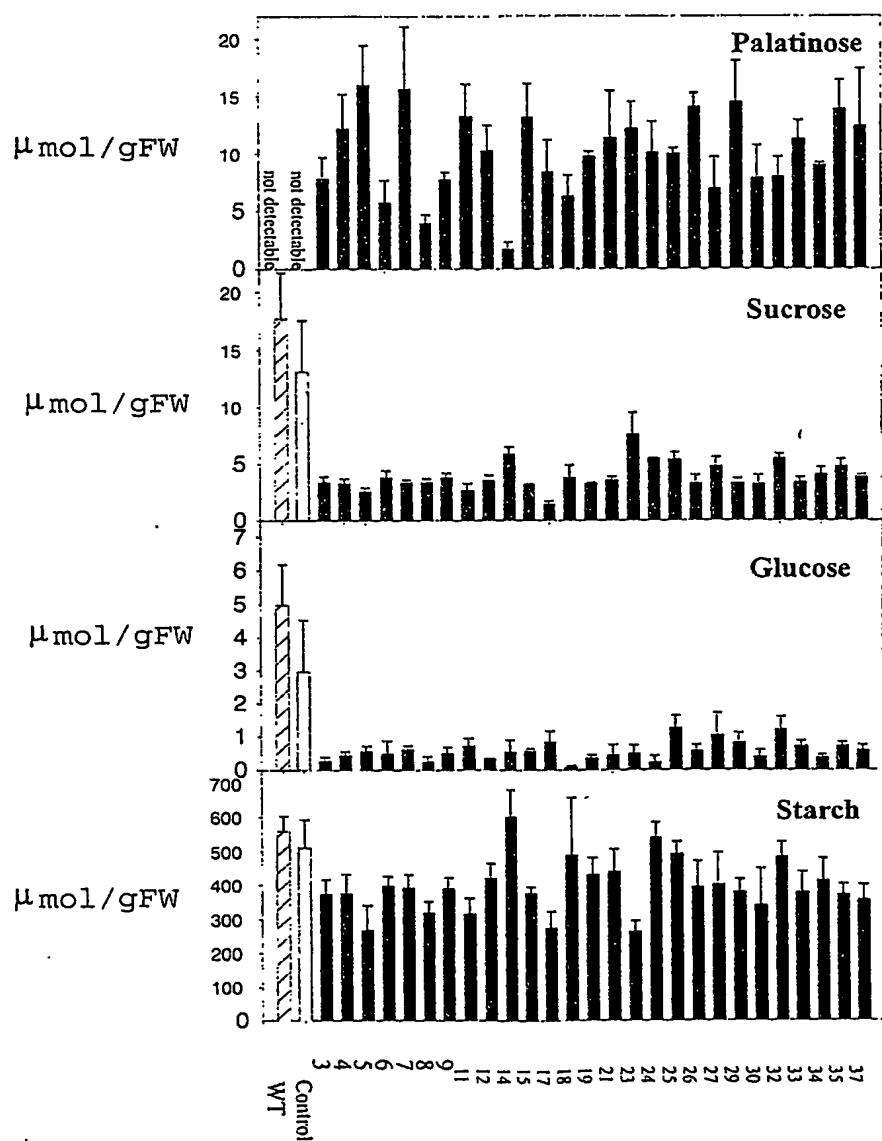


Fig. 5

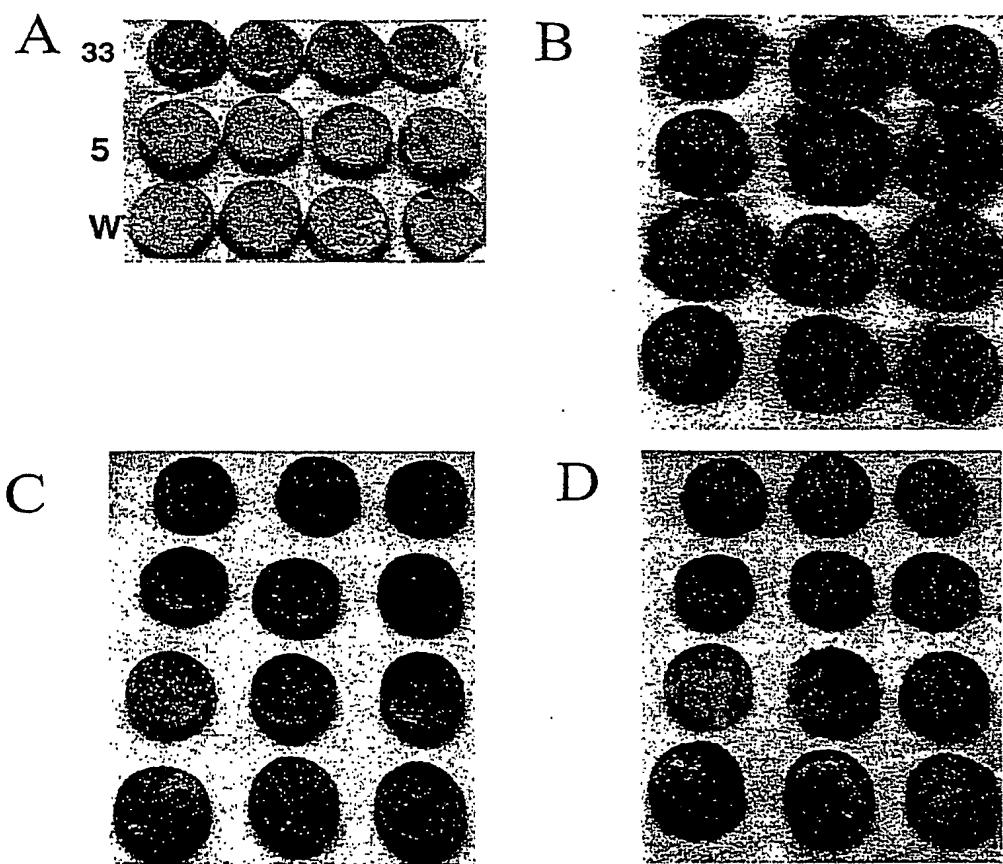


Fig. 6

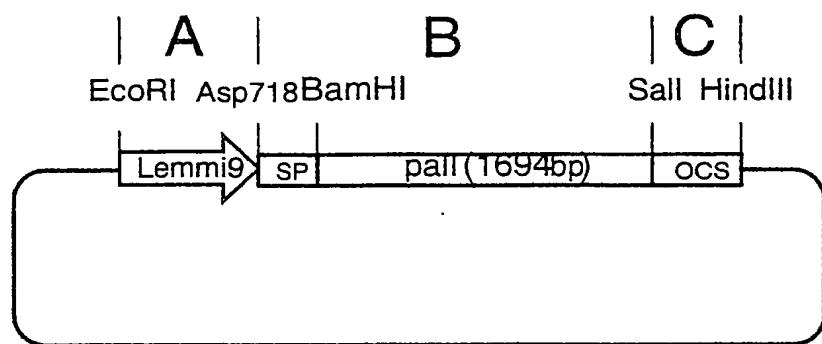


Fig.7

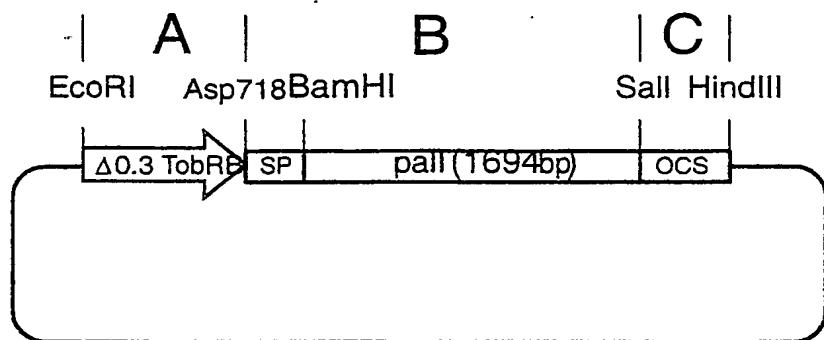


Fig.8